

35
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS GENÉTICAS DE LOS LOCI
DE POLYMARKER EN UNA MUESTRA ALEATORIA DEL
VALLE DE MÉXICO Y SU APLICACIÓN EN EL CAMPO
FORENSE**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

SERGIO LUJA CASTILLO

266179 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



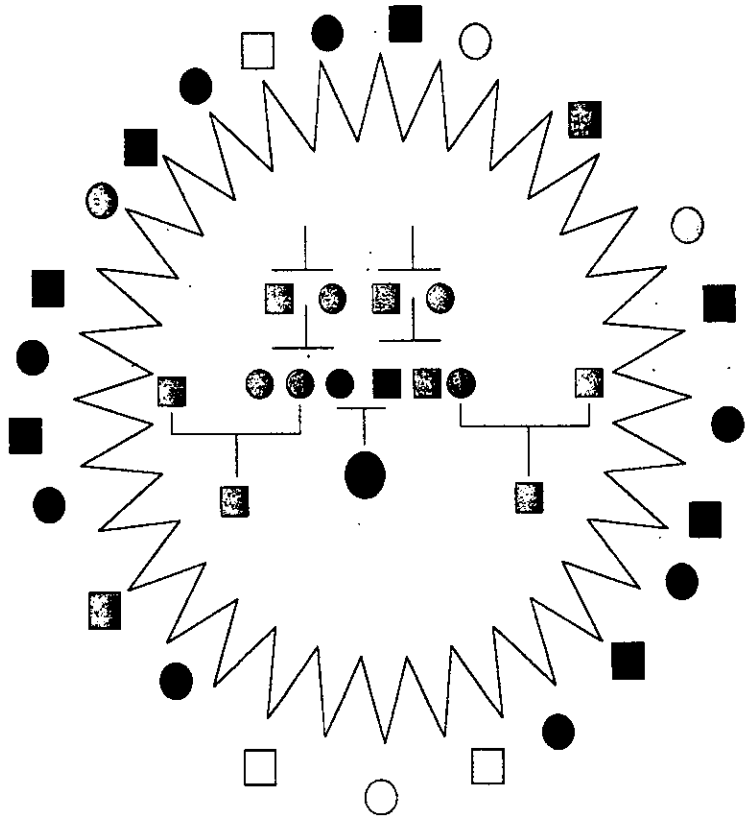
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

DESCRIPCION A:



Sergio Luján Castillo

INTRODUCCIÓN

En todas las épocas, el ser humano ha tenido la necesidad de identificarse ante la sociedad a diario, antes sólo bastaba el propio testimonio del interesado para que se considerara la persona que decía ser; así el recuerdo que se conservaba de los aspectos generales, los rasgos fisonómicos y la voz entre otras, permitía identificar a la persona.⁽³⁾

Hay ocasiones que se sabe o se sospecha que un determinado individuo no quiere identificarse por sí mismo y para lograr su identidad será necesario alterar una o varias de sus características actuales con otras debidamente fichadas que le correspondieron anteriormente; es por esto que el sistema de identificación civil es totalmente mutable ya que puede cambiarse en un momento dado siendo muy frecuente en aquellas personas que constantemente se encuentran al margen de la ley, la necesidad de identificar a estos individuos se hizo más patente en el campo de la administración de justicia pues la reincidencia de los delincuentes en sus crímenes demandaba sin tardanza crear métodos eficaces para su identificación.^(3, 4)

Hasta antes de los ochentas, las técnicas convencionales para identificar individuos eran muy comunes como la dactiloscopia, el retrato hablado, la fotografía, el retrato de envejecimiento, la antropometría y las señas particulares que solamente son útiles cuando se requiere identificar individuos íntegros físicamente. Si embargo, estos no son útiles o no son suficientes en los casos que se requiere identificar cadáveres (quemados, mutilados, momificados) irreconocibles o cuando se quiere comparar una muestra o evidencia biológica (sangre, cabellos, piel, semen) procedentes de la escena de un delito que pertenecen o tienen que ver con un individuo sospechoso relacionado con el hecho. También no son totalmente excluyentes en relación al parentesco biológico u otros problemas de consanguinidad en los que se requiere tener la certeza de la relación biológica entre 2 individuos.⁽⁵⁾

Los sistemas proteícos comúnmente utilizados en la identificación de personas son los antígenos del grupo sanguíneo, enzimas plasmáticas, enzimas eritrocitarias y proteínas antigénicas del complejo mayor de histocompatibilidad o HLA, desafortunadamente estos sistemas proteínicos tiene poca variabilidad en la población por lo que funcionan sólo por exclusión y se requiere probar varios marcadores hasta encontrar la diferencia entre la evidencia biológica y el sospechoso, es decir cuando los antígenos del sospechoso concuerdan con los de las muestras problema no se puede hacer diagnóstico de identidad puesto que estos marcadores se encuentran en una proporción elevada en la población y pudiera concordar en ambas muestras solamente por azar. Por último, las proteínas son poco estables y fácilmente se desnaturalizan con los cambios ambientales por lo que no son útiles cuando hay que identificar muestras que han estado en condiciones muy agresivas del medio ambiente.⁽⁵⁾

En la década de los ochentas, se desarrollaron sistemas de mayor sensibilidad para la identificación, refiriéndose al ADN y así al descubrimiento de marcadores genéticos a este nivel, los cuales son muy variables en las poblaciones humanas; ésto permitió la identificación de personas con gran certeza ya que esta metodología cuenta con un poder discriminante superior al 99%, a esta metodología se le conoce como las "huellas genéticas del ADN" o "DNA fingerprint"^(5, 6). En los países que se emplearon inicialmente estos marcadores de ADN se determinó la distribución de frecuencias genéticas y alélicas para formar un banco de datos y con esto, tener un soporte técnico que permita identificar por exclusión a una persona en toda una población de referencia.^(2, 6)

Los estudios para el ADN en el campo forense resultan laboriosos y costosos pero indispensables, razón por la cual la finalidad del presente trabajo es contribuir a la formación de un banco de datos en el Valle de México de 5 loci polimórficos en el genoma humano.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	i
RESUMEN.....	viii
CAPÍTULO I.- GENERALIDADES DEL ADN.....	1
1.1.- Los comienzos.....	1
1.2.- Mendelismo.....	2
1.3.- Descubrimiento del ADN "Primeros inicios".....	4
1.4.- El modelo del ADN de Watson y Crick.....	7
1.5.- Ubicación del ADN.....	9
1.6.- Organización, transcripción y replicación del ADN humano.....	10
1.7.- Propiedades del ADN.....	13
1.8.- Organización del genoma humano.....	16
1.9.- Mutaciones genéticas.....	19
CAPÍTULO II.- LA IDENTIFICACIÓN DESDE EL PUNTO DE VISTA FORENSE.....	22
2.1.- Etapas en la identificación de personas con propósito forense.....	22
2.2.- Sistema jurisdiccional.....	23
2.3.- Sistemas tradicionales de identificación con fines forenses.....	25
2.4.- Marcadores genéticos tradicionales en la identificación con fines forenses.....	26
2.5.- Sistemas de identificación en base al estudio del ADN.....	31
2.5.1.- Análisis tipo southern blot o RFLP.....	33
2.5.2.- Reacción e cadena de la polimerasa o PCR.....	35
A) Dot-blot de tipo radiactivo.....	37
B) Reverso dot-blot no radiactivo.....	37

C) Comparación con ladders alélicos.....	39
2.6.- Ventajas de la PCR sobre el RFLP en la genotipificación forense.....	39
2.7.- Criterio para el empleo de marcadores genéticos en la aplicación forense.....	41
2.8.- Genética de poblaciones.....	42
CAPÍTULO III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
CAPÍTULO IV.- OBJETIVOS.....	47
CAPÍTULO V.- HIPÓTESIS.....	49
CAPÍTULO VI.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN Y CRITERIOS DE ELECCIÓN EN EL ESTUDIO POBLACIONAL.....	50
6.1.- Tipo de estudio.....	50
6.2.- Población.....	50
6.2.1.- Criterios de inclusión.....	51
6.2.2.- Criterios de exclusión.....	51
CAPÍTULO VII.- METODOLOGÍA APLICADA EN LA DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO.....	52
7.1.- Extracción del material genético.....	52
7.1.1.- Extracción del ADN en fase orgánica a partir de células sanguíneas.....	52
7.1.2.- Extracción del ADN en sangre con anticoagulante.....	53
7.2.- Medición de la concentración del ADN genómico.....	54

7.3.- Cuantificación de ADN en gel de agarosa por comparación con estándares de concentración.....	55
7.4.- Amplificación de fragmentos polimórficos del ADN por la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
7.5.- Determinación del producto de amplificación de los 5 locus de polymarker en gel de agarosa.....	58
7.6.- Hibridación de los 5 loci amplificados de polymarker con la metodología "reverso dot-blot".....	59
7.7.- Desarrollo de color en las tiras.....	61
CAPÍTULO VIII.- RESULTADOS.....	62
CAPÍTULO IX.- TRATAMIENTO Y ANÁLISIS.....	66
9.1.- Cálculo de la homocigicidad y heterocigicidad.....	69
9.2.- Cálculo del poder de discriminación.....	70
9.3.- Cálculo del poder de coincidencia al azar.....	70
CAPÍTULO X.- DISCUSIÓN.....	74
CAPÍTULO XI.- CONCLUSIONES.....	79
CAPÍTULO XII.- RECOMENDACIONES.....	81
REFERENCIAS.....	82
ANEXO A	87
A.1.- REACTIVOS.....	87
A.2.- MATERIAL.....	93
A.3.- EQUIPO.....	95

GLOSARIO.....97

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1.1.- Dominancia y recesividad.....3

1.2.- Clasificación del ADN repetitivo en el genoma.....17

1.3.- Esquema representativo de la composición genómica en el humano.....19

1.4.- Mutaciones de transición provocadas por agentes químicos.....21

1.5.- Mutaciones de transversión provocadas por agentes químicos.....21

1.6.- Mutaciones fuera de fase provocadas por agentes químicos.....21

2.1.- Proteínas plasmáticas y enzimas celulares que presentan polimorfismo.....27

2.2.- Poder de exclusión para cada uno de los antígenos eritrocitarios.....28

2.3.- Poder de exclusión para cada una de las enzimas eritrocitarias.....29

2.4.- Poder de exclusión para cada una de las enzimas plasmáticas.....29

2.5.- Poder de exclusión de las proteínas antigénicas de HLA (serológico).....29

2.6.- Ventajas de la PCR sobre el RFLP.....40

8.1.- Información general de los 5 locus que integran el kit polymarker.....62

8.2.- Frecuencias alélicas relativas observadas en los 5 loci de polymarker.....63

8.3.- Frecuencias genéticas observadas en los 5 loci de polymarker64

9.1.- Distribución alélica en el Valle de México.....66

9.2.- Distribución alélica en el Valle de México.....67

9.3.- Frecuencias genéticas observadas y frecuencias genéticas esperadas.....67

9.4.- Heterocigocidad + homocigocidad = 1.....	70
9.5.- Valores de discriminación.....	71
9.6.- Poder de coincidencia al azar.....	72
9.7.- Total de genotipos posibles.....	72
9.8.- Índice de contenido polimórfico.....	73
10.1.- Frecuencias alélicas relativas de diferentes razas humanas.....	76

FIGURAS

1.1.- Modelo molecular del ADN propuesta por Watson y Crick.....	8
1.2.- Nomenclatura para los cromosomas.....	11
1.3.- Empaquetamiento del ADN para la formación de la cromatina.....	12
1.4.- Esquemmatización de los modelos moléculas B y Z del ADN.....	16
2.1.- Polimorfismos en el ADN.....	32
2.2.- Cortes de ADN en sitios palindrómicos por enzimas de restricción.....	34
2.3.- Esquemmatización de la metodología del RFLP.....	34
2.4.- Esquemmatización de los pasos de la PCR.....	36
2.5.- Esquemmatización de la hibridación reverso dot-blot.....	38
2.6.- Genotipificación sobre gel de poliacrilamida.....	39
8.1.- Tira de nylon para genotipificar los 5 locus de polymarker.....	62
8.2.- Frecuencias alélicas relativas de los 219 individuos de la población de estudio.....	63
8.3.- Frecuencias genéticas de los 219 individuos de la población de estudio.....	65

RESUMEN

Es importante reconocer que hoy en día las ciudades de los países desarrollados están amenazados por la violencia de generaciones jóvenes; muchos de estos individuos tienen ideas extrañas y liberales aprendidas por ciertos principios filosóficos en la sociedad en las que se desarrollan y conviven. Expertos han asegurado que la conducta antisocial puede resultar en un homicidio o suicidio por diferentes causas, la gran mayoría es por el nivel económico, algunos por conseguir nuevos tópicos, otros tienen la curiosidad por el escepticismo y con el tiempo los jóvenes creen ser los elegidos por fuerzas o señales que provienen fuera de este mundo. Desde luego, estas ideas se han ido transmitiendo entre las comunidades de todo el mundo y México no ha sido la excepción.⁽⁵⁰⁾

La identificación de personas en la sociedad no es tarea fácil, existen diferentes formas de relacionarlas ya sea por sus pertenencias u objetos personales. Otra alternativa de relacionar es a través de los rasgos fisonómicos que presenta cada individuo y que se evalúa arbitrariamente (fenotipo), mientras que la identificación de las personas a nivel molecular está determinada por la herencia a través de la molécula de ADN que es transmitida de los progenitores (padre-madre) a los descendientes (hijos) guardando íntimo parentesco biológico.

Por esto el sistema de justicia se ha visto en la necesidad de emplear técnicas muy sensibles de análisis que permitan realizar con mayor certeza la identificación de la(s) persona(s) involucradas en hechos delictivos y la exclusión de parentesco con gran certeza. La técnica de los fragmentos de restricción de longitudes polimórficos (RFLP) fue la primera en emplearse en el campo forense, desplazó de forma significativa a los marcadores genéticos que anteriormente se empleaban para identificar a personas

involucrados en algún delito. Desafortunadamente esta metodología presenta algunos inconvenientes como la cantidad de muestra requerida para su análisis, el tipo de muestra empleada, la aplicación o uso de radiactividad, el tiempo para obtener resultados, entre otros.^(1, 26, 29, 32)

Actualmente la técnica que se emplea en el campo forense es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una técnica de amplificación *in vitro* de una región de ADN específica de la que se obtienen un gran número de copias, y supera en sensibilidad a la técnica del RFLP.^(1, 26, 29, 32)

Existen diferentes laboratorios en el mundo que fabrican y venden oligonucleótidos específicos para el ADN humano que se emplea en el campo forense para tipificar regiones polimórficas en el genoma de todos los individuos, este tipo de tipificación se le conoce como genotipificación de los marcadores del ADN. Las compañías que los comercializan recomiendan evaluar los marcadores genéticos en la población para conocer la distribución de frecuencias genéticas y alélicas para determinar el poder de discriminación y el índice de coincidencia al azar entre 2 individuos no relacionados en la población.⁽²⁾

En el laboratorio de genética forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal se analiza un conjunto de sistemas genéticos ofrecido en un estuche comercial denominado Polymarker, que incluye a los loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 Y GC localizados en los cromosomas 19, 4, 11, 7 y 4 respectivamente, estos 5 locus fueron evaluados a partir de una muestra aleatoria poblacional de 219 personas pertenecientes al Valle de México.

Los resultados obtenidos señalan que la muestra está en equilibrio con la ley de Hardy Weinberg, la capacidad de diferenciar 2 individuos no relacionados fue de 0.994772 con un índice de coincidencia al azar de 2 en 1,000 individuos de un total de 972 genotipos posibles, observándose una heterocigocidad de 0.69 para GC, 0.49 para

GYPA, 0.47 para D7S8, 0.45 para HBGG y 0.42 para LDLR. El loci más polimórfico resulto ser el GC con un valor de 0.55.

En conclusión, el kit de Polymarker es adecuado para emplearse en estudios de identificación de personas y en problemas de paternidad.

CAPÍTULO I.- GENERALIDADES DEL ADN

1.1.- LOS COMIENZOS.

Las primeras ideas sobre la herencia aparecen hace 6,000 años según algunas piedras de tumbas caldeas en las que están representados árboles genealógicos. En cuanto a la herencia humana, en Talmud se menciona la hemofilia desde hace 1,500 años. Aristóteles, en el siglo II a.C., pensaba que el semen era un producto de la sangre que tenía el poder de dar vida al embrión que se formaba en el útero por la coagulación de la sangre menstrual, esta idea permaneció por casi 2,000 años hasta que William Harvey (XVII) demostró en experimentos con terneras que no había evidencia de coagulación de sangre menstrual y si aparecía un pequeño embrión en desarrollo que aumentaba en tamaño y en complejidad gradualmente durante todo el periodo de gestación.⁽⁷⁾

El científico Regnier Graaf, fue el primero en reconocer que la esencia de la concepción esta en la unión del huevo y el espermatozoide. En la segunda mitad del siglo XVII De Graaf descubrió pequeñas protuberancias en los ovarios de los mamíferos y que hoy se le conocen como los folículos de Graaf, esta fue la primera vez que se expuso la idea de que el espermatozoide no era el único agente hereditario, tanto el padre como la madre transmitían características a su descendencia.⁽⁷⁾

Pierre Louis Moreau de Marpertuis, estudió ciertos caracteres hereditarios en el hombre como el número mayor de dedos, la falta de pigmentación en el pelo y la piel, demostrando que estas características eran hereditarias; 100 años después se propuso la existencia de partículas hereditarias destinadas a formar parte de un cuerpo determinado a partir de dos progenitores.^(7.8)

1.2.- MENDELISMO.

La historia de nuestras actuales ideas sobre genética empieza con los trabajos de Gregorio Mendel, en la segunda mitad del siglo XIX. Mendel hizo sus descubrimientos más relevantes a través del análisis cuidadoso de los resultados del cruzamiento de variedades de guisantes (*Pisum sativum*). Por entonces estos experimentos no eran nuevos, T. A. Knight (1823, Inglaterra) mostró los resultados del cruzamiento de distintas variedades de guisantes. Encontró que en la primera generación F1 había dominancia de un color de semilla. Si en estas plantas se daba la autopolinización, las plantas de la segunda generación F2 tenían los colores de los progenitores. Otros obtenían resultados semejantes, pero ninguno de estos contabilizó el número real de distintos tipos de progeñie resultante de varios cruzamientos. Nadie antes que Mendel pensó, que las unidades heredables obedecían leyes estadísticas.⁽⁷⁾

Para cada característica física un individuo posee 2 factores. Si estos factores son idénticos en el individuo es homocigótico; pero si estos factores son diferentes, entonces el individuo es heterocigótico. Cuando un carácter se manifiesta en forma heterocigótica dicho carácter es dominante y el que no se manifiesta se le denomina recesivo. En 1909 Johansen, acuñó el término gen para estos factores hereditarios. Los genes responsables de los caracteres opuestos alternos a ese gen se le llaman alelos.⁽⁷⁾

Con anterioridad se pensaba que la concepción implicaba la mezcla de las sustancias hereditarias de ambos padres, por lo que cada progenitor transmitía un poco de todas y cada una de las características. Mendel demostró que esto no era cierto; por ejemplo, una planta alta no siempre transmite su altura a la progeñie. Si era heterocigótica existía una probabilidad igual de transmitir el gen para la altura o bien para estatura baja (ver tabla 1.1). De forma semejante, una persona con polidactilia (factor dominante en el hombre) tenía la misma posibilidad de transmitir

a cada hijo el gen de polidactilia que el gen de manos normales. Resulta extraordinario que Mendel formulara esta ideas sin ningún conocimiento sobre la naturaleza de estos factores hereditarios.^(7, 8)

TABLA 1.1.- T: gen dominante de la altura, t: gen recesivo. En la generación F2 se obtendrá un equilibrio, donde la progenie probablemente resultarán 3 individuos altos de estatura (TT y 2Tt) y 1 bajo de estatura tt (Emery y Mueller, 1992).

	PADRES			
	Tt	Tt		
Gametos	T o t	T o t		
Progenie	TT	Tt	Tt	tt
	1 TT	2 Tt		1 tt

Las formas de segregación de ciertos caracteres (*genes*) en el análisis, Mendel concluyó dos leyes.

- 1) Los caracteres no se mezclan sino que se **segregan** al azar y pasan de una generación a la siguiente.
- 2) Los caracteres que determinan una característica en particular no son afectados por caracteres que determinan para otra característica distinta.

Actualmente, la nueva genética ha denominado a la herencia como la parte genómica segregada al azar de dos progenitores, donde las regiones genómicas que se heredan en la forma mendeliana pueden ser de 3 formas:

1. **Herencia autosómica dominante:** se determina al genotipificar la heterocigocidad en el par de alelos uno dominante y otro recesivo (**Aa**) prevaleciendo el alelo A.
2. **Herencia autosómica recesiva:** se determina al genotipificar la homocigocidad en el par de alelos, ambos son recesivos (**aa**).
3. **Herencia autosómica codominante:** se determina al genotipificar la heterocigocidad en el par de alelos dominantes (**AB**) y ambos prevalecen.

Algunos autores describen a las **herencias ligadas al sexo** como una cuarta forma de herencia mendeliana.⁽⁷⁻¹⁰⁾

1.3.- DESCUBRIMIENTO DEL ADN "PRIMEROS INICIOS".

Sorpresivamente el ADN fue descubierto mientras Darwin y Mendel estaban trabajando. En 1869, el químico F. Miescher desarrollaba sus experimentos sobre la composición química del núcleo de la célula, revelando una composición muy alta de fósforo llamándolo nucleína. A pesar de que estos experimentos habían demostrado que el ácido nucleico era la sustancia química existente en los núcleos, muchos bioquímicos continuaron creyendo durante los años que las proteínas constituían la sustancia básica de la vida. Los resultados de algunos experimentos lograron demostrar que esta visión era incorrecta.⁽⁷⁾

Existen 2 tipos de bacterias de neumococo causantes de neumonía, según el aspecto de sus colonias cuando crecen en cultivos. Estas 2 formas son llamadas rugosas (R) y lisas (S). En 1928 Griffith, demostró que si una colonia de tipo S se destruía por

ebullición y los restos eran mezclados con cepas R vivas algunos de estos últimos eran transformados en bacterias S. Esto significa que una sustancia presente en las bacterias de cepa S muertas habían sido transferidas a las bacterias de tipo R cambiando la naturaleza genética de éstas. En 1944 estos experimento fueron repetidos por Avery, MacLeod y McCarty. Sus investigaciones demostraron que la sustancia que producía el cambio en los neumococos era un ácido nucleico al purificar los extractos de bacterias S muertas.⁽⁸⁻¹⁰⁾

En 1935, Beadle y Tatum, indujeron mutaciones al azar utilizando rayos X para radiar esporas de *Neurospora*, células latentes y resistentes importantes para la supervivencia y reproducción. Buscaron cepas que no crecieran, al menos que se agregaran al medio ciertos compuestos bioquímicos sencillos como los metabolitos (productos intermediarios). La idea era que si un gen mutante no estaba produciendo una cierta enzima, entonces el producto común de una enzima podría no ser producido y la ruta bioquímica podría tener una detección mortal. Podría decirse que la ruta bioquímica estaría bloqueada en un paso crítico. Pero al incorporar el producto ausente del paso bloqueado podría desbloquearse la ruta y permitir que el paso siguiera hasta el final, lo que le permitiría al hongo crecer.

Una vez que se identificaran los mutantes nutricionales las cepas pudieran mantenerse y utilizarse para determinar las bases hereditarias de las deficiencias enzimáticas. Todas las deficiencias enzimáticas resultaron de cambios simples de un gen en particular, de aquí la frase "un gen una enzima" o en otras palabras "se requiere la acción de un gen para producir una enzima". La idea de Garrod había sido redescubierta y confirmada. Los biólogos estaban entonces más seguros de que un gen específico era el responsable de la presencia o ausencia de una proteína específica.⁽⁹⁾

En 1952. Alfred Hershey y Margaret Chase, llevaron a cabo un experimento clásico que en retrospectión por lo menos establecía firmemente que el ADN era el material

genético. Trabajando con partículas virales que atacaban a las células bacterianas, estos virus bacterianos fueron llamados bacteriófagos o fagos. Cada partícula de fago consta de cabeza y cola, tiene una cubierta de proteína que recubre al núcleo central de ácido nucleico. Por medio de su cola, el fago se ancla a la bacteria y tras la infección se produce en el interior de la célula bacteriana nuevas partículas de fago completas con su cubierta proteica.

La ingeniosa técnica de Hershey y Chase, fue que marcaron la cubierta proteica de las partículas de fago con azufre radiactivo, y el ácido nucleico con fósforo radiactivo. No hay azufre en el ácido nucleico y casi no hay fósforo en la proteína. Entonces permitieron que los bacteriófagos marcados infectaran a las bacterias. Después separaron a las bacterias de los restos de los bacteriófagos marcados, cuando se analizaron las bacterias infectadas encontraron que únicamente había entrado en las células bacterianas el fósforo radiactivo de los ácidos nucleicos.^(8, 9)

La tarea siguiente fue observar la molécula de ADN tan cerca como fuera posible y desde todos los ángulos posibles. Durante mucho tiempo se pensó que las bases nitrogenadas, adenina, timina, citosina y guanina, aparecían con frecuencias iguales. De hecho, se creyó que la unidad básica del ADN era un simple tetranucleótido repetitivo formado por los cuatro nucleótido diferentes en igual proporción. En 1950, Erwin Chargaff mostró que el ADN de diferentes especies tenía cantidades diferentes de las 4 subunidades, y como regla general las cantidades de timina y adenina siempre son iguales a las de guanina y la citosina.^(8, 9)

La cristalografía de rayos X ayudó a explorar la estructura fina de los cristales. Básicamente, la técnica consiste en dirigir rayos X a un cristal y observar como los rayos son desviados por la estructura molecular repetitiva dentro del cristal. Entre más cercanas estén las estructuras repetidas en forma regular es más grande el ángulo en el cual son desviados los rayos X. El patrón producido en una placa fotográfica consiste en líneas y puntos distribuidos radicalmente. Así fue como

Franklin y Wilkins tuvieron una idea general acerca de la molécula de ADN y que aún no se conocía en detalle.⁽⁸⁻¹¹⁾

1.4.- EL MODELO DE WATSON Y CRICK DEL ADN.

Con datos de investigaciones llevados a cabo con el ácido desoxirribonucleico, a James D. Watson y Francis H. Crick; le sirvieron como hipótesis para que la molécula de ADN quedara establecida en el año de 1953 de la siguiente manera.

El modelo del ADN involucra 2 cadenas polinucleotídicas enredadas en forma helicoidal, las 2 cadenas son antiparalelas y están unidas por enlaces de puentes de hidrógeno con el apareamiento específico de las bases entre la A-T y G-C haciendo que la unión sea complementaria, las bases son planas haciendo que la estructura se estabilice como si fueran monedas apiladas al rededor de un eje girando en sentido de las manecillas del reloj; en el esqueleto de la doble hélice los grupos fosfato y pentosas que están alternados quedan orientados fuera de la estructura. La distancia entre cada par de bases es de 0.34 nm que corresponde a una periodicidad principal y la periodicidad secundaria corresponde a 1 vuelta y esta formada por 10 pares de bases con una distancia de 3.4 nm como se muestra en la figura 1.1.^(8, 9)

El modelo de Watson y Crick, sugería un mecanismo semiconservador, en donde las 2 cadenas de la doble hélice se separan durante la duplicación, pero cada una permanecía intacta actuando como un patrón para el ensamblaje de una pareja nueva.⁽⁸⁻¹⁴⁾

En 1957 Matthew Meselson y Franklin Stahl se empeñaron en determinar cómo se realizaba la duplicación del ADN. Su procedimiento utilizó 2 herramientas modernas de la biología, los compuestos biológicos marcados con isótopos radiactivos y la ultracentrifugación. Utilizando técnicas especiales para separar ADN

bacteriano en solución de cloruro de cesio, donde cada población de moléculas de ADN queda colocada a cierta altura de acuerdo con su densidad. Puesto que las bacterias se cultivan en nutrientes con nitrógeno 14 normal, se disponía entonces de una línea de referencia preparada con ADN normal. Después se estableció una segunda línea de referencia, en esta ocasión para ADN extraído de células que habían sido desarrolladas por muchas generaciones en un medio de cultivo que contenían nucleótidos con nitrógeno 15 radiactivo. Ya que el nitrógeno 15 sedimenta en una posición inferior en el tubo de centrífuga, y es más pesado que el nitrógeno 14.⁽⁹⁾

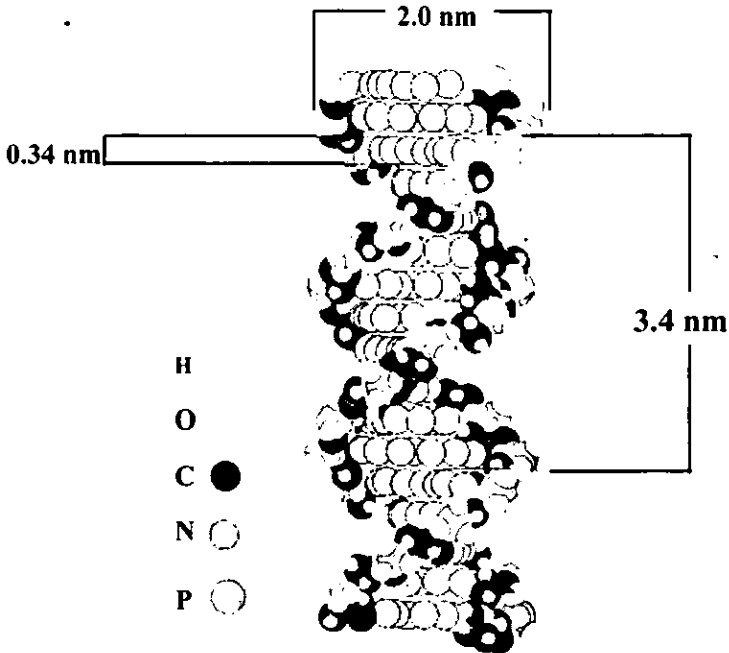


FIGURA 1.1.- Esquematización de la molécula de ADN; (modificado de Wallace R. y cols, 1991).

Su técnica, consistió en cultivar las bacterias en un medio con nucleótidos N^{15} durante muchas generaciones, así que casi todo el ADN en cada bacteria estaría formado por N^{15} . Las bacterias de este cultivo se cosecharon, lavaron y resuspendieron en un medio de cultivo que contenía solo nucleótido con N^{14} . Se permitió un solo ciclo de duplicación y las células en este momento se retiraron del cultivo y el ADN se extrajo y se centrifugó en gradiente de $CsCl_2$ (cloruro de cesio). El resultado fue claro al sostener la hipótesis de la duplicación semiconservadora, pues las 2 cadenas de la doble hélice se separan, pero cada cadena permanece íntegra.⁽⁹⁻¹¹⁾

1.5.- UBICACIÓN DEL ADN.

En el interior de todas las células del cuerpo humano se encuentra el citoplasma y un corpúsculo que se tiñe fuertemente llamado, núcleo. El citoplasma es un semi fluido que baña al núcleo, en este fluido están contenidos los ribosomas, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y varios organelos que se aprecian con la microscopía electrónica. El núcleo está rodeado por membranas que lo separan del citoplasma y que en su interior se encuentran los cromosomas que están compuestos por unidades proteicas y ADN, donde se encuentran los genes; a este tipo de ADN se le conoce como ADN genómico.⁽⁷⁾

Hasta hace unos cuantos años, el ADN mitocondrial atraía poca atención. Pero está claro que en la actualidad los genes mitocondriales codifican para algunas proteínas importantes que casi todas son propias del organelo como es el citocromo b y la citocromo oxidasa; ambas enzimas están implicadas en la producción de energía. Sin embargo, hay que destacar que el código genético mitocondrial es diferente al código del ADN nuclear. La importancia en la progenie es que siempre será de origen materno; ya que los espermias casi no tienen citoplasma y las mitocondrias

están relacionadas solamente en la producción de energía para darles movimiento al esperma a través del flagelo.⁽⁷⁾

1.6.- ORGANIZACIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN DEL ADN HUMANO.

De manera general, el genoma humano contiene aproximadamente 6×10^9 pares de bases por célula somática o diploide y 3×10^9 pares de bases por célula gaméticas o haploide; este ADN está repartido en 44 cromosomas autosómicos y 2 sexuales o 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (XX o XY) respectivamente, para cada tipo de célula.⁽¹⁴⁾

Los cromosomas no tienen un grosor uniforme en toda su longitud, sino que presentan una constricción o porción más estrecha llamado centrómero, este es el responsable del movimiento de los cromosomas durante la división nuclear; este tiene diferentes posiciones a lo largo del cromosoma. El centrómero divide al cromosoma en 2 brazos, siendo *p* el más corto y *q* el mas largo. Con esta nomenclatura y con las técnicas de bandeo cromosómico, permitió ubicar y ordenar por regiones los genes a lo largo de cada cromosoma (ver figura 1.2).⁽¹⁵⁾

Para que cada cromosoma representara una doble hélice de ADN, las hélices deberían estar muy enrolladas y compactadas, puesto que la cantidad de ADN presente en cada núcleo es tal que si estuvieran completamente extendidos sumarían varios metros ¿cómo es posible empaquetar el ADN?, si las células son muy pequeñas. Con el empleo de la microscopía electrónica permitió estudiar en forma más detallada a la **cromatina** que consiste en el empaquetamiento del ADN con proteínas, formando un complejo para hacerlo más manejable y compacto en la célula. El componente proteico principal de la cromatina son las histonas, estas son

proteínas básicas con carga parcial positiva ricos en residuos de lisina y arginina desempeñando un papel importante en la fijación del esqueleto azucar-fosfato que tiene carga parcial negativa.⁽⁷⁻¹⁵⁾

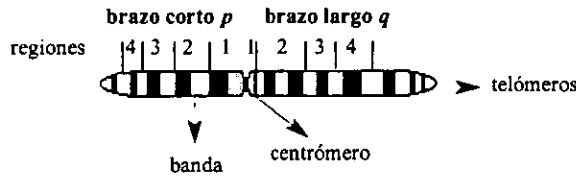


FIGURA 1.2.- Representación esquemática en la nomenclatura de un cromosoma; (modificado de Salamanca, 1990).

En 1975, Oudet y colaboradores determinaron que el primer paso de la condensación comprende la formación de los **nucleosomas**, estas estructuras son cuentas que contienen 2 vueltas de ADN y son la parte fundamental de la cromatina. Hasta 1977, Finch y colaboradores determinaron que cada nucleosoma está compuesto por las histonas H2A, H2B, H3, Y H4 formando un octámero donde existen aproximadamente 146 pb de ADN, los nucleosomas adyacentes están separados por un ADN de enlace de 54 pb y unida por una quinta histona llamada H1 propiciando que la condensación sea mucho mayor y haciéndose notar como una fibra de 30 nm de diámetro que parecen cuentas ensartadas en un hilo, como se muestra en la figura 1.3; así, la cromatina queda condensada 8,000 veces en relación al ADN extendido de forma natural.⁽⁷⁻¹⁴⁾ Se ha estimado que hay aproximadamente 3.4×10^7 nucleosomas repartidas en los 46 cromosomas donde aproximadamente tendrán 2.6×10^8 pares de bases por cromosoma autosómico.^(15, 16)

Algunas regiones de la cromatina son activas y otras inactivas. La cromatina inactiva se le conoce como **heterocromatina** y hay 2 tipos, la **constitutiva** y la **facultativa**. La

heterocromatina (condensada e inactiva) se encuentra en regiones cercanas al centrómero y en los extremos del cromosoma (telómeros). La heterocromatina facultativa en ocasiones está condensada pero otras veces es transcrita activamente y por consiguiente no está condensada apareciendo como una **eucromatina**. Un ejemplo es el de los 2 cromosomas X en las hembras de los mamíferos, un cromosoma X esta casi completamente inactivo para la transcripción y en los machos está completamente activo.⁽¹⁵⁾

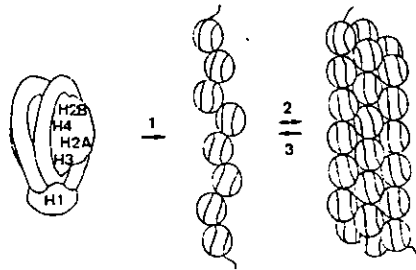


FIGURA 1.3.- Empaquetamiento del ADN para la formación de la cromatina; (Ochoa S., 1979).

El ADN activo para su transcripción, es sensible al ataque de nucleasas y algunas regiones son excepcionalmente sensibles, con frecuencia se ha encontrado que las regiones hipersensibles contienen sitios de control de transcripción como el de los genes que se presentan a menudo en conglomerados para ciertas regiones de cada cromosoma. Dentro de estas regiones, los genes pueden estar separados por ADN inactivo. La unidad de transcripción que es la porción del gen es copiada por la ARN polimerasa, estos sitios constan de regiones codificantes de ADN llamados exones interrumpidas por secuencias intercaladas de ADN no codificantes llamadas intrones. Durante el procesamiento del ARN, los intrones son removidos y los exones son unidos por acción enzimática de las ARN ligasas para la formación del

ARN mensajero maduro, que saldrá del núcleo al citoplasma para la traducción en la formación de aminoácidos.⁽¹⁵⁾

La replicación del ADN comienza en varios sitios a la vez, estos sitios se le conocen como burbujas de replicación en cada cromosoma siguiendo las reglas del apareamiento de bases durante la fase S del ciclo celular, cada tira de la doble hélice se replica de manera simultánea por mecanismos muy diferentes. Un complejo de proteínas desdobladoras y desestabilizadoras incluyendo a la ADN polimerasa replica la tira guía en forma continua en dirección 5'→ 3'. La tira rezagada se replica en forma discontinua en la misma dirección 5'→ 3' con fragmentos de 150 a 250 nucleótidos llamados cebadores para que polimericen varias regiones de ADN, posteriormente los cebadores son eliminados y las tiras de ADN recientemente sintetizadas son unidas por ADN ligasas.⁽¹⁰⁻¹⁴⁾

1.7.- PROPIEDADES DEL ADN.

Por su naturaleza de la molécula de la doble cadena, hoy se entienden muchas propiedades, entre las más importantes están:

La **absorbancia**, donde las moléculas de purina y pirimidina absorben fuertemente la radiación electromagnética en la región de UV del espectro, teniendo una máxima absorbancia a los 260 nm. Por lo general a esta longitud de onda se emplea como base para establecer concentraciones de ADN siempre y cuando se mantenga un efecto hipercrómico, es decir, cuando la molécula de la doble hélice esta desnaturalizada tiene la máxima absorbancia a 260 nm.^(8, 10, 11, 17)

En la superficie exterior de la tira de ADN es muy aniónica debido a la presencia de grandes cantidades de grupos fosfato, cada uno de los cuales esta totalmente ionizado a pH fisiológico; esta propiedad de **interacción iónica** es aplicable para

eluir por electroforesis a la molécula de ADN en un campo eléctrico de corriente continua, donde la molécula se desplazada hacia la terminal anódica.^(8, 10, 11, 17)

Debido a la rigidez de la duplo-hélice y a la inmensa longitud del ADN en relación con su escaso diámetro, las disoluciones de ADN son muy **viscosas**, razón por la cual el ADN exhibe un comportamiento ideal como soluto cuando está formando disoluciones altamente diluidas.^(8, 10, 11, 17)

Uno de los primeros problemas que se presentaron una vez que se demostró que el ADN era el material genético, fue la longitud de las moléculas presentes en las células. Los estudios iniciales en el ADN viral y bacteriano indicaban que todo programa genético en un organismo estaba presente como una molécula de ADN, en ocasiones en forma **lineal** y otras ocasiones en forma **circular**. Las moléculas de ADN se han analizado por medio de técnicas que utilizan la ultracentrifugación y los gradientes de densidad, es decir, en una solución de cloruro de cesio, cuya concentración aumenta de la parte superior del tubo hacia el fondo, cada molécula de ADN se moviliza hacia un sitio del tubo en donde la densidad del medio sea equivalente a su propia **densidad de flotación**. Una vez que la molécula llega a su lugar, la fuerza de centrifugación ya no puede afectarla y permanecerá ahí, lo cual quiere decir que ha alcanzado un equilibrio de sedimentación.^(9, 10, 11, 17)

La separación de las 2 cadenas del ADN o dúplex por medio de calor no es un hallazgo, pero cuando 2 hebras de ADN provenientes de diferentes especies llega a reasociarse, las 2 cadenas formadas esencialmente son indistinguibles del ADN natural, ya que absorbe menos luz UV., esto se debe principalmente a que el proceso de **reasociación** es muy específico y solamente las cadenas verdaderamente complementarias son capaces de asociarse. La reacción de asociación presenta una cinética de segundo orden, ya que es directamente proporcional al producto de la concentración de los reactivos. A mayor número de moléculas complementarias en

un volumen determinado, mayor frecuencia de colisión, y más rápido la formación de una estructura doble y estable.^(8, 10, 11, 17)

El hallazgo de que los ácidos nucleicos no catenarios complementarios pueden asociarse es una de las observaciones más valiosas practicadas en la biología molecular. Por un lado la observación de reasociación ha dado lugar a la investigación de la naturaleza de las secuencias de los nucleótidos dentro del ADN, lo cual ha proporcionado una nueva visión sobre la naturaleza y función del material genético. Por otro lado, dio lugar a la técnica de **hibridación molecular**, que ha proporcionado una gran cantidad de información acerca de todos los tipos y formas de los ácidos nucleicos.^(7-11, 13, 14)

Recientemente se han realizado análisis físicos más precisos donde se ha determinado que existen *in vivo* formas de ADN, la mayoría de ellas participan en el carácter helicoidal de la forma B diferenciándose de sus valores diestros exactos y de sus parámetros moleculares como el ángulo de inclinación de las bases así como el número de residuos de bases por paso de rosca entre el surco mayor y menor (como se muestra en la figura 1.4). Sin embargo, Rich y colaboradores describieron la existencia de una conformación estructural de ADN radicalmente diferente de la forma B que se ha denominado forma Z por la forma zigzagueante de los grupos fosfato-desoxirribosa; esta conformación Z participa con el mismo carácter bihelicoidal de la forma B que a diferencia de esta la hélice gira hacia la izquierda. Las diferencias estructurales de las moléculas son el resultado de cambios de conformación internos, no se puede pasar directamente de la forma B a la Z simplemente girando la hélice en forma contraria sino que se requiere hacer una serie de transformaciones en la conformación interna; este tipo de ADN está presente en los centrómeros y en los telómeros.⁽⁷⁻¹²⁾

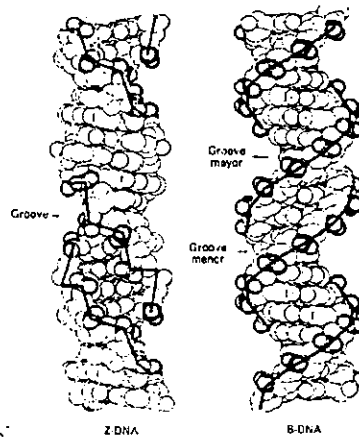


FIGURA 1.4.- Esquemización de las moléculas Z y B del ADN; (Ochoa S., 1979).

1.8.- ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO.

La curva para el ADN eucariote es muy compleja, esta complejidad cinética agregada es un reflejo de las diferentes secuencias de nucleótidos en la solución de ADN preparada a partir de organismos superiores, puede llegar a presentarse a concentraciones marcadamente diferentes. Aunque las curvas de reasociación del ADN parecen ser continuas, se reconocen 3 clases de fragmentos de ADN. Estas 3 clases se distinguen por su velocidad de reasociación, la cual refleja el número de veces que se repite dentro de esta población la secuencia de nucleótidos, a las 3 clases de cinética se denominan, *fracción altamente repetitiva*, *fracción moderadamente repetitiva* y *fracción no repetitiva* conocida como la copia sencilla o única.^(10, 16)

La fracción altamente repetitiva, la cual se define como VNTR's, que consiste en secuencias presentes por lo menos 10^4 copias por genoma y constituye cerca del

10% del ADN total. En la tabla 1.2 se esquematiza la clasificación del ADN repetitivo del genoma humano.^(10, 16)

Esta fracción del genoma se reasocia con tanta rapidez que su proceso solo se puede seguir en soluciones diluidas donde la concentración de los reactivos es muy baja. Puede variar bastante la longitud de secuencias altamente repetitivas, fluctuando desde 2 hasta menos de 300 pares de bases. A este tipo de secuencias en tándem se le conocen como ADN satélites, la función de las secuencias altamente repetitivas se desconoce por completo; tienden a localizarse en la heterocromatina constitutiva de los cromosomas, en particular en los centrómeros y se ha sugerido que intervienen en el apareamiento de los cromosomas o en la recombinación genética durante las meiosis.^(10, 16, 18)

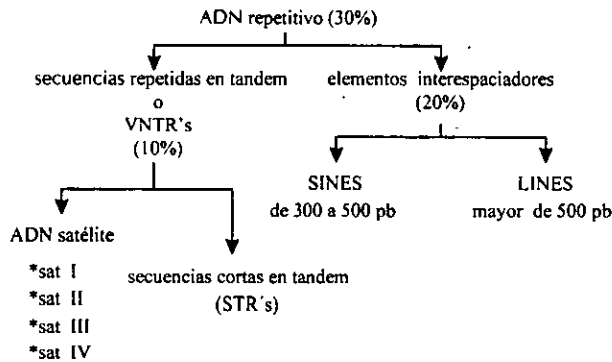


TABLA 1.2.- Clasificación del ADN repetitivo en el genoma humano; (modificado de Flouler y cols, 1988).

La subagrupación de los VNTR's están formados por los ADN satélite, que integran a polinucleótidos mayores de 10 pb y menores de 300 pb en longitud. Los ADN minisatélite comprenden a polinucleótidos mayores de 5 pb y menores de 10 pb en longitud, y los ADN microsatélite que están formados por polinucleótidos de 3-5 pb

en longitud, algunos autores lo nombran como repeticiones cortas en tándem o **STR's**.^(10, 16, 18)

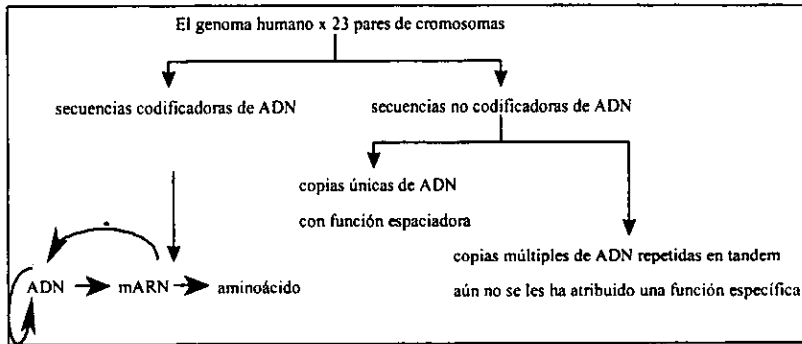
La fracción moderadamente repetitiva constituye el 20% del total del genoma. La variedad de estas secuencias repetidas puede calcularse por el análisis por su cinética de renaturalización, puesto que entre mayor sea la replicación de una secuencia, mayor rapidez con la que se asociará. Las secuencias que reasocian a esta última fracción comprende desde los 300 pares de bases y menor de los 800 pares de bases. Por lo general se piensa que la mayor parte de las fracciones moderadamente repetitivas pueden tener una función reguladora, mientras que la gran mayoría de ellas puede carecer de una función determinada. Incluso dentro de la fracción se encuentra los genes causantes de la producción del ARN de transferencia y el ARN ribosomal, así como los genes que codifican para las proteínas histónicas.^(10, 16)

La subagrupación de la fracción moderadamente repetitiva se denominan **Elementos interespaciadores repetitivos**, están constituidos por los elementos interespaciadores cortos conocidos como **SINES** que comprenden a los polinucleótidos mayores de 300 pares de bases y menores de 500 pares de bases en longitud y los Elementos interespaciadores largos llamados **LINES** que comprende a polinucleótidos mayores de 500 pares de bases y menores de 800 pares de bases.⁽¹⁶⁾

La fracción restante o secuencias no repetitivas del ADN, se compone de secuencias de nucleótidos que se reasocian con una cinética que indica que se encuentran presentes desde una hasta unas cuantas copias por genoma que fluctúan entre 800 a 2000 pares de bases. La fracción no repetitiva contiene la mayor cantidad de la información genética para la producción de proteínas; a esta familia se le conoce como la **familia multigénica** que estrictamente solo existe una copia por genoma y solamente constituye menos del 10% del genoma. La parte complementaria es la

más abundante en todo el genoma y tiene la función de espaciador de regiones exónicas (ver tabla 1.3).^(10, 16)

TABLA 1.3.- Esquema representativo de la composición del genoma humano; (modificado de de Flouler y cols, 1988).



1.9.- MUTACIONES GENÉTICAS.

A lo largo de todo el genoma existen alteraciones en la estructura del ADN denominadas mutaciones, éstas pueden o no tener efectos negativos; o bien no reflejarse en el fenotipo aún cuando el cambio se presente en el genotipo.⁽¹⁴⁾ La mutación en la cadena del ADN constituye el proceso fundamental de la genética ya que son transmitidos de los antecesores a los descendientes, este cambio ocurre constantemente en todo organismo ya que es una característica ligada al proceso de la vida.⁽¹⁹⁾

Las regiones exónicas son las más afectadas por las mutaciones, ya que puede tener diversos efectos sobre la proteína correspondiente. El cambio de un nucleótido en el ADN puede resultar afectado un triplete o probablemente sea diferente y este

codifique para el mismo aminoácido; en este caso no se producirá ninguna alteración en las propiedades de la proteína resultante, debido a la degeneración del código genético.⁽¹⁹⁾

A continuación se presenta la clasificación de las mutaciones.^(8, 19)

1.- MUTACIONES EN PUNTO.

TRANSICIÓN.	El cambio de una base <i>purina-pirimidina</i> por otra <i>purina-pirimidina</i> .
TRANSVERSION.	El cambio de una base <i>purina-pirimidina</i> por una <i>pirimidina-purina</i> .

2.- MUTACIONES FUERA DE FASE.

ADICIONES.	Se adicionan una, dos o más bases.
DELECCIONES.	Se suprime una, dos o más bases.

Los agentes mutagénicos químicos que generan alteraciones en el ADN están determinados por el desplazamiento de pares de electrones en la molécula básica haciendo que se establezca por resonancia (tabla 1.4, 1.5 y 1.6).⁽⁵⁾

TABLA 1.4.- Mutaciones de **transición** provocadas por agentes químicos; (Russell, 1980).

COMPUESTO	ESTADO NORMAL	ESTADO TAUTOMÉRICO DEL COMPUESTO
5-bromouracilo	se une con adenina	se une con guanina
2-aminopurina	se une con timina	se une con citosina

TABLA 1.5.- Mutaciones de **transversión** provocadas por agentes químicos; (Russell, 1980).

COMPUESTO	EN PRESENCIA DE	EL RESULTADO ES
ácido nitroso	adenina	hipoxantina-citosina
ácido nitroso	citosina	uracil-adenina
hidroxilamina	citosina	hidroxilaminocitosina-adenina

TABLA 1.6.- Mutaciones **fuera de fase** provocadas por agentes químicos; (Russell, 1980).

COMPUESTO	EFECCIÓN EN LA CADENA	EL RESULTADO ES
acridinas	patrón	adición en un par de bases
acridinas	nueva	delección en un par de bases

CAPÍTULO II.- LA IDENTIFICACIÓN DESDE EL PUNTO DE VISTA FORENSE

2.1.- ETAPAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE PERSONAS CON PROPÓSITOS FORENSES.

En la historia de la identificación con fines judiciales se han establecido 3 etapas diferentes que comprenden:

La primera llamada "bárbara", etapa donde se mutilaban a los reincidentes, cercenándoles las orejas, manos, nariz o se les marcaba mediante la aplicación de hierro candente que dejaba en su cuerpo señales indelebles con fines identificativos.

La segunda denominada "empírica", etapa donde comenzó a practicarse el método descriptivo en base a los rasgos fisonómicos, las particularidades que ofrece el ser humano y el método fotográfico que la policía empleó para resolver el problema de identificación y que con el tiempo fue nula.

Por último la etapa llamada "científica", que surge hacia finales del siglo pasado, donde el ser humano ha experimentado la necesidad de contar con procedimientos confiables encaminados a disponer de un amplio margen de seguridad y la mayor rapidez posible para la identificación de cualquier persona, los cuales se han perfeccionando en el curso de los años; esta necesidad se hizo más patente en el campo de la administración de justicia, pues la reincidencia de los delincuentes en sus crímenes demandaba sin tardanza crear métodos eficaces para su identificación.^(3, 4)

2.2.-SISTEMA JURISDICCIONAL.

La investigación de un probable hecho delictuoso homicidio, suicidio, violación, robo, entre otras, siempre han sido de interés y es una de las actividades que realiza el sistema jurisdiccional, ya sea por Ministerio Público, Policía Judicial, Autoridades Jurisdiccionales con la finalidad de proporcionar una adecuada identificación del precursor de los ilícitos y para lograr tal objetivo se ha apoyado de 5 disciplinas que son⁽²⁰⁾

1. **La criminología**, siendo una ciencia es la encargada del estudio del delito como conducta humana y social para la prevención del delito y el tratamiento de los delincuentes. .

2. **Policía científica**, considerada como ciencia que tiene estudio práctico de los criminales y del crimen, y mediante la aplicación de métodos científicos de investigación, da la posibilidad de describir a los autores de los crímenes y de los delitos sin emplear el sistema científico del laboratorio.

3. **Policilogía**, es una disciplina que incluye técnicas, métodos y conocimientos muy propios para ser aplicados en la localización, persecución y detección de presuntos responsables de hechos delictuosos.

4. **Medicina forense**, es una disciplina científica que aporta al juzgador las pruebas periciales de carácter médico legal, esencialmente determina las causas de muerte por las lesiones infringidas existentes en el occiso o en cierto caso da solución a otro tipo de aspectos biológicos humanos.

5. **Criminalística**, disciplina científica que se ocupa de los análisis de los indicios, denominados así a todo objeto, huella o elemento íntimamente relacionado con un presunto hecho delictuoso, cuyo estudio permite reconstruir e identificar a sus autores y establecer su participación de los mismos. Auxilia al órgano jurisdiccional

aportando pruebas materiales y periciales para darles elementos probabilísticos e identificables y reconstruibles a través de los laboratorios correspondientes de cada disciplina que integran a la criminalística, que son:

- Balística forense
- Documentoscopia
- Fotografía forense
- Dactiloscopia
- Química
- Patología
- Antropología
- Hematología
- **Genética**

En la investigación pericial de un indicio se recorren las siguientes etapas.

1. Búsqueda en el lugar de los hechos y la identificación de los indicios (ubicación y presentación morfológica).
2. La recolección, levantamiento, protección y un buen registro de la evidencia para un adecuado transporte al laboratorio.
3. Exámenes analíticos que siguen la siguiente metodología:
 - I. Exámenes visuales
 - II. Pruebas presuntivas
 - III. Pruebas confirmatorias
 - IV. Pruebas de individualización

Estos son algunos principios básicos en la criminalística, pues E. Locard estableció que existe un intercambio dinámico entre la víctima, victimario y el lugar de los hechos. Esto quiere decir que no existe un crimen perfecto, por lo tanto siempre existe *algo* en el lugar del delito e identificar ese algo es el objeto del criminalista.⁽²⁰⁾

4. Interpretación de los resultados y elaboración de los dictámenes.

2.3.- SISTEMAS TRADICIONALES DE IDENTIFICACIÓN CON FINES FORENSES.

Estos sistemas de identificación están basados por las características físicas que presenta cada persona (fenotipo).

Alphonse Bertillon crea el sistema **antropométrico** basada en 3 principios; 1) la estabilidad del esqueleto humano desde los 28 años, 2) la múltiple variedad de dimensiones que presenta el esqueleto humano comparándolos entre los individuos, 3) la facilidad y la precisión relativa con que pueden verificarse la mediciones sobre el ser humano. Para reforzar este sistema, Bertillon emplea el *retrato hablado* que consiste en la descripción de los caracteres particulares de ciertos rasgos fisionómicos como cabeza, nariz, ojos, boca y mandíbula para tener un mejor complemento de identificación.⁽⁴⁾

El sistema de la **dactiloscopia** fue perfeccionada por Juan Vucetich a partir de las formas de identificación de las huellas papilares que anteriormente Malpigüi analizó y posteriormente Francis Galton corroboró obteniendo una combinación de 1,048,576 formas de los dedos de ambas manos. La dactiloscopia es la primera marca evidente con gran poder de discriminación y hasta la fecha no se ha encontrado una huella digital igual.⁽⁴⁾

Existe, claro está, muchos otros procedimientos de identificación que en mayor o menor grado han contribuido al desarrollo y perfeccionamiento de las ciencias criminalísticas; algunos de estos son:

Método de CAPDEVIELLE: constituye un sistema de identificación basado en la descripción del ojo y la región orbital del mismo.

Sistema Dental: que consiste en anomalías y alteraciones dentarias.

Cicatriz umbilical: considera el fondo, la base, las paredes y la cavidad de dicha cicatriz para establecer los diferentes tipos de clasificación. Este sistema no es confiable ya que a través de los años tiende a modificarse.

Método Radiológico: basado en la fotografía de rayos X de los senos frontales y se requiere de grandes conocimientos médicos.

2.4.- MARCADORES GENÉTICOS TRADICIONALES EN LA IDENTIFICACIÓN CON FINES FORENSES.

El interés que se ha desarrollado en el campo de la criminalística por las técnicas con fines identificativos se ha manifestado en el empleo de proteínas como marcadores genéticos tradicionales.

Los **grupos sanguíneos** fueron los primeros marcadores genéticos en emplearse en el sistema forense; sin embargo, tienen la desventaja de que no presentan un alto polimorfismo, la tipificación se realiza con antisuero y en ocasiones se dificulta la identificación del grupo cuando la cantidad de muestra es relativamente pequeña o de mala calidad.⁽⁵⁾

La segunda generación de marcadores genéticos incluye a las **enzimas eritrocitarias** y **enzimas plasmáticas**, ambas presentan gran polimorfismo y se determinan por variantes electroforéticas; se requieren de muestras que no estén desnaturalizadas y de cantidades razonables para su análisis.⁽²¹⁾ Se ha estimado que solamente el 28% de las proteínas plasmáticas son polimórficas.⁽²²⁾

La tabla 2.1 indica los marcadores genéticos más empleados en Europa hasta fines de los setentas en la identificación de personas involucradas en un delito, la identificación de las proteínas polimórficas se realiza por electroforesis.

TABLA 2.1.- Proteínas plasmáticas y enzimas celulares que presentan polimorfismo; (Artur y cols 1990).

	<i>SÍMBOLO DEL LOCUS</i>
hap:oglobina (cadena alfa)	HP
transferrina	TF
proteína enlazante de vitamina D	GC componente específico de grupo
ceruloplasmina	CP
alfa 1 antitripsina	PI inhibidor por proteasa
alfa 1 glicoproteína ácida	ORM orosomucoide
beta 2 glicoproteína I	BG
factor properdina B	BF
complemento	
2 componente	C 2
3 componente	C 3
4 componente	C 4
6 componente	C 6
enzimas	
amilasa pancreática	AMY 2
colinesterasa	CHE 2
fosfatasa ácida 1	ACP 1
adenosin deaminasa	ADA
adenilato kinasa	AK 1
anhidrasa carbónica 2	CA 2
oxiaforasa dependiente de NADPH	DIA 2
estearasa D	ESD
galactosa 1 uridil transferasa	GALT
glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	G6PD
transaminasa glutámico pirúvico	GPT
glutation peroxidasa	GPX 1
glutación reductasa	GSR
glioxilasa I	GLXO
peptidasa A	PEPA

peptidasa C	PEPC
peptidasa D	PEPD
fosfoglucomutasa 1	PGM 1
fosfoglucomutasa 2	PGM 2
fosfogluconato dehydrogenasa	PGD
uridin minfosfato kinasa	UMPK
aconitasa	ACO 1
citidin deaminasa	CDA
alfa L fucosidasa	FUCA 2
alfa glucosidasa	GAA
transaminasa glutámico oxaloacética mitocondrial	GOT 2
hexoquinasa 3	HK 3
enzima málica mitocondrial	ME 2
fosfoglucomutasa 3	PGM 3

Las siguientes tablas indican el poder de exclusión de los marcadores genéticos más empleados en México hasta fines de los ochentas para la identificación de personas involucradas en un delito y en la exclusión de parentesco biológico.⁽²¹⁾

TABLA 2.2.- Poder de exclusión para cada uno de los antígenos eritrocitarios; (Knight, 1994).

SISTEMA ERITROCITARIO	% DE EXCLUSIÓN
MNs	32.1
Rh	28.0
KIDD	4.5
DUFFY	4.8
ABO	17.6
KELL	3.3
LUTHERAN	3.3

TABLA 2.3.- Poder de exclusión para cada una de las enzimas eritrocitarias; (Knight, 1994).

ENZIMAS ERITROCITARIAS	% DE EXCLUSIÓN
FGM fosfoglucomutasa	14.5
FAE fosfatasa ácida eritrocitaria	21.0
TGP trans glu-piru-	19.0
Glu Glucoxilasa	18.4
EsD estearasa D	9.0
AC adenilatocinasa	4.5
ADA adenosin deaminasa	4.5
6-FGM p- gluconatodeshidrogenasa	2.5

TABLA 2.4.- Poder de exclusión para cada una de las proteínas plasmáticas; (Knight, 1994).

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	% DE EXCLUSIÓN
GC	24.7
HP	17.5
GLM	06.5
KM	06.0

TABLA 2.5.- Poder de exclusión de las proteínas antigénicas del HLA; (Franco D. A., 1991).

PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS	% DE EXCLUSIÓN
HLA SEROLÓGICO	95.5

El total de exclusión para los 4 sistemas marcados en las tablas como antígenos eritrocitarios, enzimas eritrocitarias, enzimas plasmáticas y HLA serológico es del 99.7% para la población del Valle de México.⁽²¹⁾

Se han realizado estudios de frecuencias fenotípicas en diferentes grupos sociales que han contribuido a conocer la distribución de frecuencias alélicas y genéticas, que han sido empleadas para la identificación de personas y en las determinaciones de parentesco biológico.^(23, 24)

En los fluidos corporales como saliva y semen se pueden determinar ciertos marcadores genéticos como glioxilasa I, fosfoglucomutasa I, secretores de grupo sanguíneo ABO, peptidasa A y Lewis.⁽²⁵⁾

Por otro lado, las muestras biológicas de procedencia de escenas de los delitos consisten principalmente de manchas sanguíneas, manchas seminales o algún otro fluido donde la mayoría se encuentran en las superficies de las prendas; a partir de estas muestras es posible identificar al autor(es) del supuesto delito, aplicando los marcadores genéticos tradicionales siempre y cuando las muestras biológicas sean de *buena calidad y suficiente* para realizar el análisis;⁽⁵⁾ sin embargo la gran mayoría de las evidencias biológicas están expuestas a la agresividad del medio ambiente como la luz solar, temperatura, humedad, microorganismos, enzimas proteolíticas de los fluidos, y el tiempo entre otros factores que ocasionan la desnaturalización de las proteínas propiciando resultados erróneos, difíciles de interpretar o haciendo imposible la determinación del marcador.^(5,26) En las determinaciones de paternidad, la identificación del supuesto padre se realiza por la intersección entre la frecuencia de los marcadores empleados en la población y hasta ese momento se trata de una correlación.⁽²⁷⁾

Los marcadores genéticos tradicionales no se pueden aplicar en muestras de fluidos contaminados como es el producto de una violación, en tejido muscular, tejido

óseo, en cabellos con raíz, en muestras de tejido parcialmente calcinado y tejido momificado, marcando de esta manera algunas desventajas respecto a las características de la muestra para su identificación.^(5, 26)

2.5.- SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN EN BASE AL ESTUDIO DEL "ADN".

Para la identificación de una persona con gran certeza se requería del empleo de los marcadores tradicionales y de marcadores genéticos anteriormente descritos; de no ser así la identificación no era muy confiable o quedaba inconclusa.⁽⁵⁾

En 1980, Comings publica en el American Journal of Human Genetics el término "la nueva genética" al referirse al uso de técnicas de biología molecular y al enorme potencial que tienen para el estudio del genoma humano; estas metodologías impactan de manera positiva al área forense donde algunas de sus investigaciones están encaminadas a desarrollar métodos más sensibles para la identificación de personas a partir de muestras biológicas escasas que contengan células nucleadas, es decir, que involucra a la cadena del ADN que no se daña tan fácilmente en las condiciones del medio ambiente.⁽²⁸⁾

Esta metodología emplea marcadores de ADN, siendo aquellas regiones que se heredan de los antecesores a los hijos y que se identifican como bandas que se encuentran en diferentes sitios después de una elución por electroforesis. Los marcadores genéticos para el ADN están determinados por regiones polimórficas de un determinado segmento de la molécula de la doble hélice que involucra un **cambio de base o un número determinado de bases repetidas en tándem**; estos polimorfismos del ADN tienen una gran variedad de alelos existentes en la población que se encuentran en baja frecuencia.^(5, 29) Se ha estimado que por cada

200 pb al menos un nucleótido es polimórfico encontrándose con 2 o más variantes alélicas.⁽²²⁾

La figura 2.1.- representa los 2 tipos de polimorfismo que se puede encontrar a lo largo de la molécula del ADN.

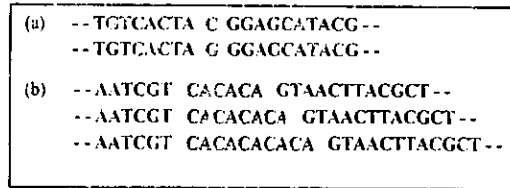


FIGURA 2.1.- Polimorfismos en el ADN, a) presenta un cambio en el par de bases C por G. b) presenta las secuencias de bases -CA- repetidas en tándem; (Davies, 1992).

El sistema criminalístico ha adoptado estos marcadores genéticos como marcos de referencia para la identificación de personas ya que se les puede relacionar por medio de una genotipificación para cada alelo, además estos tienen la ventaja de que son heredados de los antecesores a los descendientes;⁽²⁸⁾ de esta manera se ha desplazado a los marcadores genéticos tradicionales que anteriormente se empleaban pues la forma en que se heredan es de tipo autosómico dominante y autosómico recesivo, además requieren de una fenotipificación y de varias características que deben cumplir.^(5, 30)

El genoma es todo el ADN que se encuentra en el núcleo de las células como se describió en el capítulo I, sin embargo, en el sistema criminalístico una genotipificación para un locus es la región polimórfica que se determina.^(1, 5, 6)

Para determinar los genotipos de un marcador de ADN se cuentan con las siguientes técnicas moleculares:

2.5.1.- ANÁLISIS TIPO SOUTHERN BLOT O RFLP.

Existen técnicas de transferencia como el southern (ADN), northern (ARN) y Western (proteína). El primero llamado así por E. Southern que ideó la técnica en 1977, los demás fueron nombrados para diferenciar uno de otro y hoy los términos son aceptados.⁽²³⁾

En 1980, el británico A. Jeffreys perfeccionó la técnica del southern al emplearla como una herramienta más en las investigaciones forenses y la llamo "la huella digital del ADN" o "DNA fingerprinting".^(1, 5, 6, 31)

La especificidad de los perfiles de ADN es tan grande que la probabilidad de exclusión es del 99% por lo que es particular para cada individuo a diferencia de los marcadores genéticos tradicionales que en conjunto solamente excluyen el 90%.^(1, 5, 6, 31)

La huella digital del ADN está determinada por el empleo de las enzimas bacterianas o fúngicas llamadas endonucleasas de restricción que reconocen y cortan el ADN en sitios palindrómicos produciendo fragmentos de longitud variable llamados RFLP's. La figura 2.2- representa los 2 tipos de cortes existentes por las endonucleasas de restricción.^(14, 16, 30)

Los fragmentos producidos por las enzimas son separados (por electroforesis horizontal submarina en gel de agarosa) de acuerdo al tamaño, posteriormente los fragmentos se desnaturalizan dentro del gel con solución alcalina, después son transferidos a una membrana de nitrocelulosa quedando adsorbidos obteniendo así una réplica exacta del gel en la película, el siguiente paso consiste en hibridar la membrana con sondas específicas marcadas en forma radiactiva, a este paso se le conoce como hibridación tipo southern; para revelar el sitio de la molécula híbrida se somete a una autorradiografía obteniéndose una imagen con una serie de bandas de diferentes densidades y tamaño que emite radiación.^(3,4,10) El interés del área

forense son los genotipos del marcador que se determinan por medio del patrón de bandas haciendo más fácil la comparación e identificación entre personas.^(3,4,24,28) La figura 2.3.- presenta los pasos del RFLP.^(14, 29)

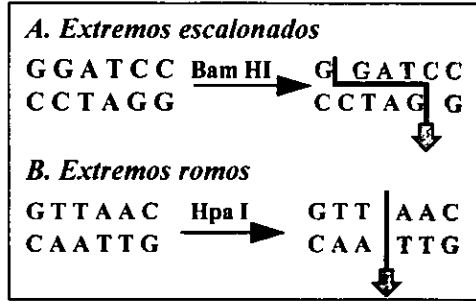


FIGURA 2.2.- Cortes de ADN en sitios palindrómicos por enzimas de restricción, (Murray, 1994).

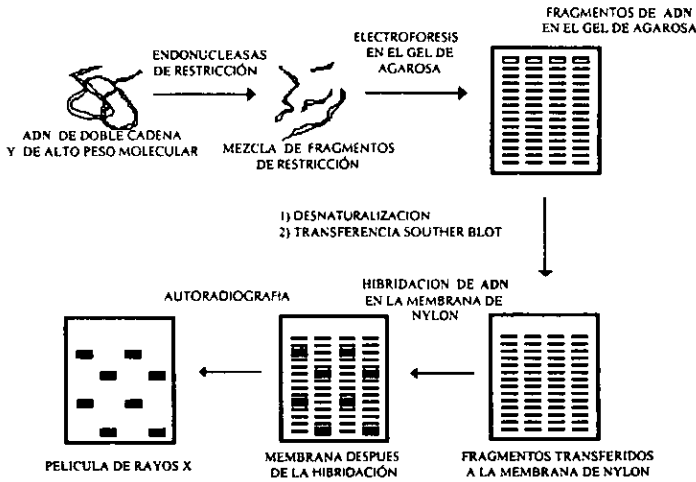


FIGURA 2.3.- Esquematización de la metodología del RFLP (modificado de Davies, 1992).

2.5.2.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA O PCR.

La PCR es una técnica de amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN basada en los postulados de Korana.

La metodología fue creada y nombrada por Kary B. Mullis y colaboradores en 1985, investigadores de la compañía CETUS, utilizado en los primeros ensayos de la PCR en forma manual el fragmento Klenow termolábil de la ADN polimerasa I de la bacteria *E. coli* para la replicación y varios baños de agua a diferentes temperaturas para la desnaturalización del ADN, la alineación de cebadores y polimerización de las regiones específicas flanqueadas.^(32, 34)

Desafortunadamente en cada ciclo se requería agregar una nueva cantidad de enzima para reemplazar a la desnaturalizada y glicerol que este terminaba por inhibir la actividad de la enzima limitando la eficiencia de la reacción, estas circunstancias determinaron que los primeros ensayos de la PCR resultaran costosos, complejas y poco eficientes.^(32, 33, 34)

Con el descubrimiento de la ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* revolucionó de cierta manera el proceso de la PCR, esta enzima presenta 2 grandes ventajas, la primera; no requiere adicionar más polimerasa después de un calentamiento, la segunda; la enzima es activa a altas temperaturas donde la alineación de los cebadores son más específicos y la síntesis de ADN es más rápida. Esto permitió que la PCR quedara automatizada al introducir la tecnología de los termocicladores reduciendo de forma significativa el costo y el manejo de las muestras (ver figura 2.4).^(33, 34)

La PCR esta siendo aplicada paulatinamente en las técnicas de clonación molecular. Su aplicación es muy exitosa cuando se amplifican en número regiones de ADN cuya secuencia nucleotídica es conocida (técnicas de secuenciación).^(7, 13, 14, 28, 32-34)

La automatización de la PCR se compone de varios ciclos y cada ciclo comprende 3 pasos en forma general a consideración: ⁽³²⁻³⁴⁾

1. Una primera temperatura de 94°C para la desnaturalización de la doble hélice.
2. Una segunda temperatura de 60°C para la alineación del par de cebadores diferentes que flanquean la región de amplificación en los extremos 5' en cada hebra de ADN desnaturalizado.
3. Una tercer temperatura donde el par de cebadores apareados actúen como iniciadores para que la enzima polimerice las regiones flanqueadas complementarias.

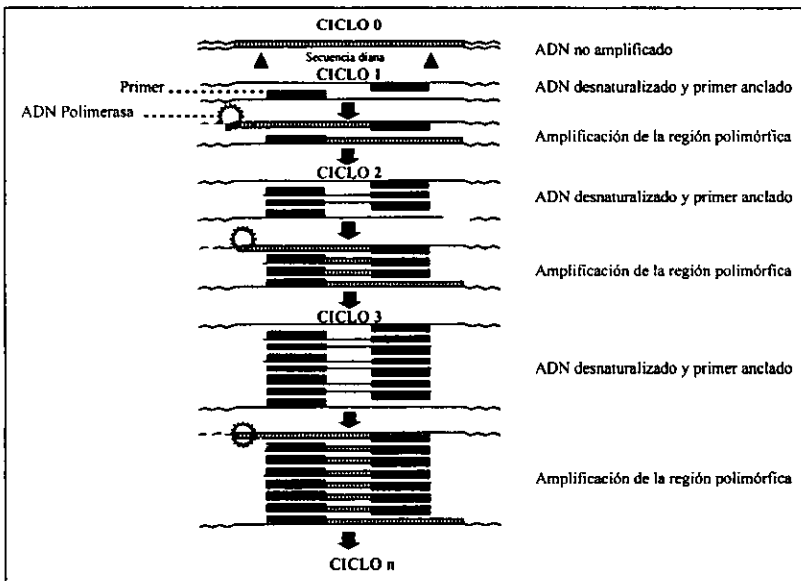


FIGURA 2.4.- Esquemización de los pasos de la PCR; (modificado de Emery A., 1992).

Para la identificación de la región amplificada se lleva a cabo por las siguientes técnicas:

- A) por el dot blot de tipo radiactivo,
- B) por el reverso dot-blot no radiactivo,
- C) por comparación de marcadores alélicos; (siendo estos 2 últimos los más empleados para el análisis forense).

A) DOT BLOT DE TIPO RADIATIVO

Es la primera técnica desarrollada para la identificación de alelos específicos a partir de fragmentos amplificados por PCR.

Esta metodología requiere de un compuesto radiactivo unido en los oligonucleótidos específicos que al hibridar con las regiones amplificadas y desnaturalizadas después de una elución y transferencia a una membrana de nylon identifican los alelos correspondientes de un genotipo cuando se exponen en películas radiográficas.^(6, 6, 29, 30)

B) REVERSO DOT BLOT NO RADIATIVO

En virtud de la comercialización de esta técnica, ya se encuentran disponibles en el mercado las tiras de nylon que contienen las regiones específicas correspondientes de los alelos, haciendo más fácil la identificación de las regiones polimórficas amplificadas como lo indica la figura 2.5.^(1, 33-38)

El reverso se aplica de acuerdo a los pasos siguientes:

- 1) La secuencia específica ya amplificada, se somete a 95°C de temperatura por 5-10 minutos con la finalidad de desnaturalizar la doble hélice, que posteriormente se adicionaran a las tiras de nylon que contienen las regiones específicas de los alelos (SSO).

2) La secuencia amplificada desnaturalizada se hibrida con los oligos específicos (SSO) cuando las condiciones de astringencia y pH así lo permitan. Los alelos se observan cuando aparecen los puntos coloridos sobre las tiras, indicando las regiones polimórficas por cambios en el par de bases.

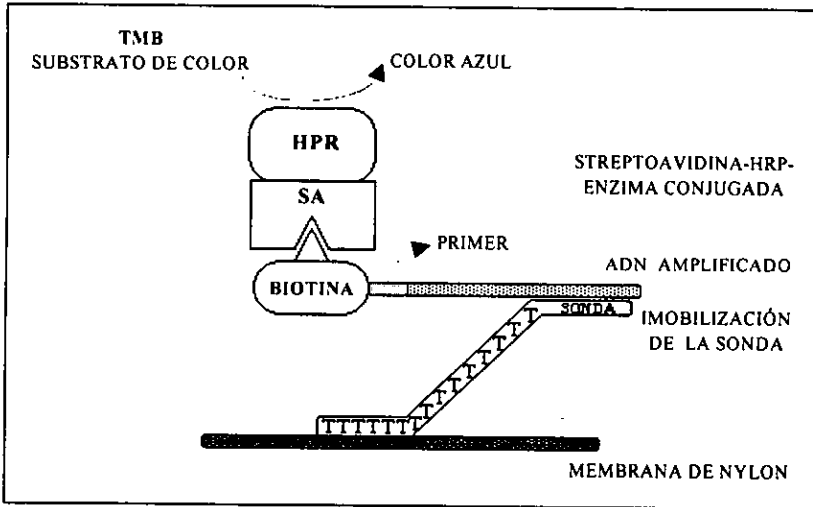


FIGURA 2.5.- Esquematación del reverso dot-blot. La región amplificada se marca en los extremos 5' del cebador con biotina y enzima peroxidasa conjugada con avidina. Posteriormente se hibridizan las regiones amplificadas con sus respectivos oligonucleótidos de secuencias específicas (SSO) que están fijados en una membrana de nylon, para la identificación de los fragmentos amplificados se adiciona peróxido de hidrógeno con el fin de hacer reaccionar la enzima con el sustrato TMB (tetrametil-bencidina) para formar un complejo, observándose como puntos azules que corresponden a un genotipo. Este tipo de hibridación es específica para determinar regiones polimórficas por cambios en el par de bases; (Reynolds R., 1991).

C) COMPARACIÓN CON LADDERS ALÉLICOS

En este procedimiento se aplica la técnica de electroforesis que eluye los fragmentos amplificados y un marcador de peso molecular en gel de poliacrilamida, este procedimiento permite separar al ADN amplificado en base al peso molecular e identificando el genotipo por comparación a la altura de la elución.^(33-34, 39-42) Este forma de genotipificación es específica para determinar regiones polimórficas repetidas en tandem como esta representado en la figura 2.6:

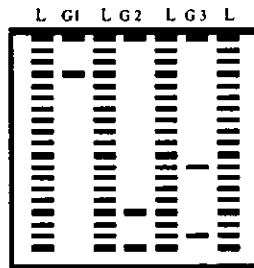


FIGURA 2.6.- Genotipificación sobre geles de poliacrilamida, (L) lader, (Gn) genotipos; (Perkin Elmer No N808- 0054).

2.6.- VENTAJAS DE LA PCR SOBRE EL RFLP EN LA GENOTIPIFICACIÓN FORENSE.

Existen ventajas de la PCR sobre los RFLP, éstas están sujetas primordialmente a la aplicación, ya que de acuerdo a las características de la criminalística, la PCR se adecua a las características de las muestras, así se observa en la siguiente tabla:

TABLA 2.6.- Ventajas de la PCR sobre el RFLP; (modificado de Mc Pherson y cols, 1994).

Ambas metodologías dependen de la disponibilidad de ADN, siendo esta la parte fundamental del tiempo para obtenerlos los resultados.

- La PCR es simple y rápida.
- La genotipificación se realiza en un día.
- La PCR no involucra radioactividad.
- Las amplificaciones de los segmentos polimórficos se realizan por automatización reduciendo el error de operación e incrementando el número de muestras para la amplificación con el mismo periodo de tiempo.
- La PCR emplea cantidades de 2ng de ADN, adecuadas para el empleo de material genético proveniente de cabello con raíz, manchas de sangre, manchas de saliva, manchas de semen, tejido óseo, tejido momificado y tejido en parcial descomposición.
- La PCR permite el análisis simultáneo de 2 o más secuencias
- Los análisis se pueden repetir varias veces o amplificar para genotipificar otros marcadores.
- ◆ Para aplicar la técnica del RFLP se requieren de cantidades mínimas de 25-50 ng de ADN y no se aplican en muestras pequeñas.
- ◆ Para la obtención de los RFLP's se fracciona solamente en una ocasión el ADN con enzimas de restricción
- ◆ Los RFLP's implican radioactividad.
- ◆ La genotipificación se obtiene de 20-30 días.

2.7.- CRITERIOS PARA EL EMPLEO DE MARCADORES GENÉTICOS EN LA APLICACIÓN FORENSE.

Para que un marcador genético pueda ser útil como parámetro de identificación, son importantes las siguientes características:

Un marcador genético es cualquier caracter heredado y se estudia no por su interés intrínseco sino por su naturaleza para investigar la heredabilidad de un segmento particular de un cromosoma es a través de una familia. Un marcador útil debe ser estudiado fácilmente con el material disponible de manera rápida, debe ser heredado de forma simple y crucialmente de características polimórficas; esto es, que presente diferencias genéticas entre la gente y que éstas se puedan estudiar a través de un árbol genealógico, deben presentarse con baja frecuencia en la población así como un alto índice de heterocigocidad, el ambiente no debe de influir en la expresión del marcador y deben de permanecer sin cambio durante la vida.⁽²⁹⁾

Los marcadores considerados como polimorfismos genéticos son aquellos donde la frecuencia del genotipo excede el 1% de la población, excluyendo a muchos sistemas genéticos de interés en medicina como los errores congénitos del metabolismo cuya frecuencia en ningún caso es superior al 1% estipulado.⁽¹⁹⁾

Por el método de análisis, éstos deben de ser confiables en la determinación, debe ser fácil de analizar e interpretar, que su determinación se realice sin ambigüedad, que se diferencie cualitativamente sobre los alelos existentes y que consuman el mínimo de material.^(19, 29)

2.8.- GENÉTICA DE POBLACIONES.

El estudio de la herencia de los genes nos obliga a examinar las leyes que la rigen, así como la herencia de los caracteres, y aquellos caracteres que son continuos y que reflejan la acción aditiva o multifactorial en las poblaciones humanas.⁽⁴³⁾

Las características genéticas se encuentran determinadas por movimiento y combinación de los genes que van de generación en generación, significando una distribución de material genético de la población progenitora entre los descendientes.⁽⁴⁴⁾

La diversidad genética en la población esta influenciada por sus propiedades recombinantes y evolutivas, y además por la frecuencia relativa de los alelos proyectados a los genotipos resultantes como los parámetros de referencia de los genes, en el enfoque genético se toma en cuenta la frecuencia genética para definir la estructura biológica de la poblaciones y predecir cambios evolutivos en la misma.⁽⁴³⁾

La genética poblacional genera el conocimiento que ayuda a entender el fenómeno de nivel biológico, ya que también se llega a conocer las limitaciones de la técnica, así también establecer un banco de datos sobre genotipos y como consecuencia aplicarlo cuando así se presenten los fenómenos que se quieren explicar para asignar las probabilidades genotípicas.⁽⁴⁵⁾

Los métodos estadísticos nacen con la determinación de polimorfismo de ADN por medio de la técnica RFLP, provocando un impacto sobre pruebas de identidad en el área forense. Un método estadístico conservador fue desarrollado y se baso sobre los parámetros físicos definidos arbitrariamente. Estas aproximaciones permitieron la clasificación de datos sobre alelos continuos, generando así un simple y manuable

sistema de datos, y su diferenciación al grado de determinar la frecuencia de un grupo de alelos.^(46, 47)

En las poblaciones grandes donde los cruzamientos ocurren al azar y en las que no se producen trastornos por influencias externas, los dominantes no aumentan a costa de los recesivos. En realidad, en tales poblaciones las proporciones relativas de los distintos genotipos permanecen constantes de una generación a otra y en proporciones de:

$$p^2:2pq:q^2 = (p + q)^2$$

Esto se conoce como el principio o la ley de Hardy Weinberg, que fue postulado en 1908 de forma independiente por el matemático inglés G.H. Hardy, y el médico alemán W. Weinberg. Esta ley es una de las más importantes en la genética humana por lo que es digna de considerarse con mayor detalle. De la relación que existe entre las frecuencias alélicas y genéticas se desprende que en la posición de equilibrio la cantidad máxima de heterocigotos presentes correspondientes al valor $2pq$ no exceda el 50% de la totalidad de los genotipos comprendidos en la distribución; esta propiedad tiene importancia práctica ya que si un marcador genético muestra una proporción excesiva de heterocigotos por arriba del 50% se puede afirmar que en la población existe polimorfismos donde la desventaja del mutante se manifiesta en baja adaptabilidad del homocigoto con ventaja significativa a favor del heterocigoto (evolución del alelo).⁽⁴³⁾

El sistema forense ha empleado el modelo matemático de Hardy Weinberg para determinar la distribución de frecuencias alélicas y genéticas de los marcadores de ADN, el objetivo de aplicar esta ley es de que las frecuencias serán constantes a través de las generaciones y totalmente adecuadas para ser aplicados con fines identificativos en una determinada población panmítica de estudio.^(1, 2, 5, 40, 41, 46)

Uno de sus objetivos de la genética forense es contar con otro sistema de identificación confiable, lo cual es a través de regiones altamente polimórficas de ADN, y que al determinar estos se aplican los términos "exclusión o no exclusión" con alta confiabilidad.^(1, 2, 5, 40, 41, 46)

CAPÍTULO III.- PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Los marcadores tradicionales empleados como sistemas de identificación en la determinación de parentesco familiar e identificación de personas participantes en hechos delictivos no tienen gran poder de inclusión, como consecuencia, no es confiable cuando se identifica a una persona; se requieren entonces de métodos físicos que presenta la persona que se busca.

Los marcadores de grupos sanguíneos, las enzimas de los eritrocitos y las proteínas del plasma sanguíneo, son empleadas cuando se dispone de cantidades razonables para su análisis y estas se conserven íntegras para su proceso; *no* es posible aplicarlos en muestras de tejido muscular, tejido óseo, en cabellos, en muestras de tejido parcialmente calcinados, en manchas sanguíneas y en ciertos fluidos corporales como el semen.

Con la demanda de crear nuevas metodologías para el proceso de identificación, se elige la tecnología de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Esta metodología se limita exclusivamente a muestras donde existen células nucleadas. La PCR ha desplazado las técnicas serológicas y electroforéticas que anteriormente se empleaban para llevar a cabo la correlación entre personas.

El punto principal de controversia en México, para los fines identificativos en los casos legales al emplear diferentes marcadores es de no contar con un banco de datos que excluya al 99% de la población, actualmente sucede lo mismo al ser empleados los marcadores polimórficos del ADN de origen humano; es por esto que surgen las siguientes preguntas.

¿Qué significa cuando coincide el patrón genético de una muestra problema con la de un individuo?, ¿Qué significa cuando se conoce la probabilidad de encontrar 2 marcadores genéticos de 2 individuos no relacionados en la población?, ¿Cuál es la finalidad de contar con el poder de discriminación del sistema?, ¿Cuales son las ventajas y las desventajas de la técnica?

Para responder estas preguntas, se debe tomar en cuenta que los marcadores genéticos para el ADN humano que puedan ser útiles en el proceso de exclusión, deben de tener gran poder de discriminación o capacidad de distinguir genéticamente a 2 individuos al azar de la misma población, esto es que entre más alelos tenga un marcador genético (mayor polimorfismo) y más uniforme sea la distribución en la población, mayor será el poder de discriminación del marcador polimórfico de ADN en la población.

Para ayudar a resolver este problema de tipo forense así también para contar con otra herramienta dentro del proceso de identificación, se analizará la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del sistema *Polymarker* de los loci: LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 Y GC, localizados en los cromosomas 19, 4, 11, 7 Y 4 respectivamente de una muestra poblacional representativa del Valle de México.

Con el estudio de los marcadores polimórficos del sistema *Polymarker* para el ADN, se determinarán las frecuencias genotípicas y el grado de confiabilidad en el proceso de exclusión de un individuo la población del Valle de México, esto contribuirá a aumentar el banco de datos para un sistema de identificación altamente confiable con aplicación a la criminalística en la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del D.F. y a su vez contar con un soporte técnico básico para el apoyo de los estudios de esta naturaleza solicitados por las autoridades competentes.

CAPITULO IV.- OBJETIVOS

4.1.- OBJETIVO GENERAL.

- Determinar la distribución genotípica y alélica de los cinco loci **LDLR** (Receptor de la Lipoproteína de Baja Densidad), **GYPA**(Glicoforina A), **HBGG** (Hemoglobina G Gammaglobina), **D7S8** (locus ligado a la fibrosis quística), y **GC** (Componente Específico de Grupo), en una muestra poblacional del Valle de México

4.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar la frecuencia de cada alelo de los 5 loci de polymarker.
- Determinar la frecuencia de cada genotipo en los 5 loci de polymarker.
- Determinar la heterocigocidad de los 5 loci que integran el polymarker.

- Determinar la homocigocidad de los 5 loci que integran el polymarker.
- Determinar el valor de X^2 (chi cuadrada) en cada genotipo de cada locus de polymarker.
- Determinar el poder de discriminación total de los 5 locus de polymarker.
- Determinar el poder de coincidencia al azar total de los 5 locus de polymarker.

CAPITULO V.- HIPÓTESIS

Si las frecuencias genéticas de los 5 locus de polymarker permanecen constantes a través de las generaciones, se tendrá un equilibrio de Hardy Weinberg en la población del Valle de México; entonces será posible obtener:

- El poder de discriminación con un valor superior al 94% de los 5 locus analizados en la población del Valle de México.
- Una heterocigocidad superior al 75% en la población del Valle de México.

CAPÍTULO VI.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN Y CRITERIOS DE ELECCIÓN EN EL ESTUDIO POBLACIONAL

6.1.- TIPO DE ESTUDIO.

- ⇒ Observacional
- ⇒ Prospectivo
- ⇒ Transversal
- ⇒ Descriptivo

6.2.- POBLACIÓN.

- La población sujeta al estudio será de 220 personas sin parentesco biológico que serán invitadas a participar en dicho estudio poblacional.
- Las muestras biológicas de cada individuo que se someterán al estudio serán una de las siguientes:

Fluidos biológicos tales como: sangre, semen, saliva.
- Las muestras se recolectarán de individuos que vivan en el D.F., en la zona metropolitana de la Ciudad de México y en el Estado de México. La identidad de los voluntarios se mantendrá en total anonimato.

6.2.1.- Criterios de inclusión:

Se incluirá a cualquier persona haciendo caso omiso de sexo y edad, siempre y cuando acceda a donar una de las muestras biológicas propuestas anteriormente.

6.2.2.- Criterios de exclusión:

No se analizarán muestras de personas que refieran parentesco biológico entre ellos.

6.2.3.- Criterios de eliminación:

- a) Se eliminarán del estudio aquellas muestras que no contengan la cantidad requerida de ADN para su análisis.
- b) Se eliminarán del estudio las muestras que resulten contaminadas con material genético de origen humano ajeno a la muestra biológica.

CAPÍTULO VII.- METODOLOGÍA APLICADA EN LA DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

7.1.- EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.

Primeramente se recolectan 5 ml de sangre venosa en tubos de vacutainer con anticoagulante (EDTA) y sistema al vacío.

7.1.1.- Extracción de ADN en fase orgánica a partir de células sanguíneas.

1.- En un tubo de 1.5 ml se adicionan de 10 a 50 μ l de sangre total con anticoagulante (EDTA).

2.- Se adiciona 0.5 ml de amortiguador de digestión al microtubo de 1.5 ml con la sangre.

3.- Se adiciona 15 μ l de proteinasa K (10 mg/ml), se mezcla suavemente y se incuba a 56°C por 2 horas.

4.- Se purifica el ADN al hacer la extracción de proteínas con 0.5 ml de la solución fenol-cloroformo (1:1), se agita con vórtex por 15 segundos o hasta la formación de una emulsión.

5.- Se centrifuga de 3-5 minutos de 10-15 mil revoluciones por minuto o a máxima velocidad a temperatura ambiente.

6.- Se transfiere la parte acuosa a otro tubo de 1.5 ml y se adiciona 0.5 ml de solución fenol-cloroformo (1:1), se repiten por 3 veces los pasos del 4 al 6.

7.- Se adiciona etanol absoluto frío el doble del volumen de la solución acuosa a una temperatura de -20°C por 45 minutos. Para favorecer la precipitación del ADN se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad, se decanta el exceso de etanol al poner en contacto el tubo con papel desecante.

8.- El ADN precipitado se lava con 0.5 ml de etanol al 70%, se centrifuga a máxima velocidad; el etanol se desecha por decantación.

9.- El residuo de alcohol se evapora en un baño térmico a 55°C .

10.- El ADN se disuelve en un volumen de 200 μl de buffer TE pH , durante 2 horas a 55°C o toda la noche a temperatura ambiente.

7.1.2.- Extracción del ADN en sangre con anticoagulante.

1.- Se adiciona 2 ml de sangre con anticoagulante a un tubo de 12x75, posteriormente se agrega el mismo volumen del buffer de lisis (sacarosa-tritón 300 nM). Se mezcla ocasionalmente y se guarda en un vaso de hielo.

2.- Se centrifuga a 3000 rpm/6 minutos a temperatura ambiente.

3.- Se decanta el sobrenadante y se colocó 1 ml del buffer de lisis (sacarosa tritón 300 nM), se resuspende y se transfiere a un tubo de 1.5 ml para microcentrífuga.

4.- Se centrifuga por 2 minutos a máxima velocidad.

5.- Se repite el paso 3 y 4 una vez más.

6.- Se resuspende el botón con 570 μl de NaCl 5 mM y 30 μl de SDS al 10%, se agita por 5 minutos hasta observar la formación de un coágulo.

- 7.- Se adiciona 200 μ l de NaCl saturado, se agita hasta homogeneizar.
- 8.- Se centrifuga a 12,500 rpm por 10 minutos a 4°C.
- 9.- Se decanta el sobrenadante a un tubo de 12x75, en el botón quedan las proteínas.
- 10.- Al sobrenadante se le agrega el doble de etanol absoluto frío para que el ADN precipitara.
- 11.- Al precipitado de ADN, se le recogió con un capilar limpio y estéril; se enjuaga con etanol al 70% frío en un tubo de 12x75, se deja secar el ADN a temperatura ambiente o en un baño María a 55°C.
- 12.- Se disuelve el ADN en 50-200 μ l de buffer TE pH 8 dependiendo del ADN obtenido, durante 2 horas a 55°C o toda la noche.

7.2.- MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADN GENÓMICO.

Cuantificación del ADN por técnica espectrofotométrica en la región U.V.

- 1.- Para determinar la concentración de ADN en el buffer TE se adicionó 10 μ l de esta solución y se agrega 1 ml de NaOH 0.1 N en un tubo de ensaye de 12x75, con el fin de desnaturalizar el ADN.
- 2.- Se leen las absorbancias de la disolución en una celdilla de cuarzo a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La absorbancia de a 260 nm debe de estar dentro del rango de 0.05 y 1.5. Si esto no ocurre ajustar el volumen de la solución del ADN hasta que la absorbancia esté dentro del rango deseado.

3.- Se guardan las soluciones de ADN a 4°C.

4.- La fórmula con la que se calcula la concentración de ADN es:

$$(A_{260}/0.025) \times (10 \mu\text{l sol.de ADN} / 1000 \text{ ml de NaOH}) = \text{mg / ml de ADN.}$$

A 250 nm con una densidad óptica de 1 corresponde a un factor de un STD de ADN de concentración de 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

5.- El cociente de las lecturas (260/280) determina la pureza del ADN y el valor debe de estar entre 1.8-2.0, si la muestra está contaminada con proteínas o fenol, el valor de (260/280) debe de estar por arriba del valor de 2.0 y la cuantificación del ADN no se puede llevar a cabo. El valor a 310 nm debe de ser menor que 0.02 y sirve para determinar la materia particulada.

7.3.- CUANTIFICACIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA POR COMPARACIÓN CON ESTÁNDARES DE CONCENTRACIÓN.

1.- Se prepara el gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x.

2.- El gel se moldea en un recipiente nivelado de 11x14 cm y con un peine para hacer pozos.

3.- En un panel de microtitulación se mezclan 7 μl de la solución de (ADN y buffer TE) con 3 μl de loading buffer, esta mezcla se deposita en un pozo de agarosa. En los pozos restantes se aplican 3 μl de cada estándar de ADN de concentraciones: 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, y 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

- 4.- El recipiente de 11x14 cm que contiene el gel se coloca en una cámara de electroforesis horizontal, se adiciona buffer TAE 1x hasta cubrir el gel
- 5.- Se enciende la fuente de poder que esta conectada a la cámara de electroforesis a 100 voltios, dejando correr el loading hasta una distancia de 1.5 cm del punto de aplicación.
- 6.- El gel se sumerge en 200 ml de agua y se adiciona 3 μ l de bromuro de etidio (0.5 mg/ml), se agita por 5 minutos; posteriormente el gel se lava con agua para eliminar el exceso de bromuro.
- 7.- El gel se colocó sobre el transilminador de luz UV para determinar la fluorescencia de la interacción ADN de doble hebra-bromuro de etidio, la concentración del problema se cuantifica por comparación con los estándares de concentraciones conocidas.
- 8.- Se fotografía el gel con el equipo "eagle eye" en presencia de luz UV.

7.4.- AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DEL ADN POR LA METODOLOGÍA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Se amplifican las regiones polimórficas de 5 loci: LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC (kit **polymarker** para uso forense, Perkin-Elmer CAT N808-0057) de cada muestra genómica en estudio como se indica a continuación.

- 1.- Todas las muestras fueron marcadas con un número consecutivo para su identificación.

2.- En un tubo para amplificación genómica se adicionan los siguientes reactivos:

a) 40 μ l de mezcla de reacción amplitype PM que contiene AmpliTaq DNA Polimerasa, $MgCl_2$, dATP, dGTP, dCTP, dTTP en solución amortiguadora.

b) 40 μ l de Primer AmpliType PM que contiene a los 12 primers en solución amortiguadora.

3.- Se programa el termociclador 480 Perkin-Elmer de acuerdo a la siguiente tabla:

Para 32 ciclos

Un ciclo contiene los siguientes pasos:

DESNATURALIZACIÓN	ALINEACIÓN	EXTENSIÓN
60 segundos a 94°C	30 segundos a 60°C	30 segundos a 72°C

El paso final consiste de:

ESTABILIZACIÓN DEL ADN AMPLIFICADO
7 MINUTOS A 72° C

4.- En un pozo de un panel se transfiere el volumen adecuado de la solución ADN buffer TE que contenga entre 2 y 10 ng de ADN genómico, si la concentración es mayor al del rango anterior la alicuota se diluye con agua destilada desionizada hasta obtener

una concentración que este entre 0.1 a 0.5 ng de ADN genómico/ μl donde el volumen final será de $20\mu\text{l}$.

5.- Posteriormente se adicionan 2 gotas de aceite mineral a cada tubo de amplificación.

6.- Finalmente se adiciona la dilución de los $20\mu\text{l}$ (del paso 4) en los tubos para amplificación por debajo de la capa de aceite mineral que contiene ambas mezclas de reacción anteriormente mencionadas. El volumen final en los tubos de amplificación siempre son de $100\mu\text{l}$.

7.- Todos los tubos se depositan en el interior del termociclador de acuerdo a la numeración, comienza la amplificación.

7.5.- DETERMINACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LOS 5 LOCI DE POLYMARKER EN GEL DE AGAROSA.

1.- Se prepara el gel de agarosa al 4% en buffer TAE 1x.

2.- El gel se moldea en un recipiente nivelado de 11×14 cm y con un peine para hacer pozos. Se dejó hasta solidificar sobre la cámara de electroforesis.

3.- En un panel de microtitulación se mezclaron $7\mu\text{l}$ de la solución del producto de amplificación con $3\mu\text{l}$ de loading buffer, esta mezcla se depositó en un pozo de agarosa y así sucesivamente se depositan cada una de las muestras problemas amplificadas en los demás pozos del gel. Para cada amplificación se emplea un testigo positivo y testigo negativo.

- 4.- Se enciende la fuente de poder que va conectada a la cámara de electroforesis a 100 voltios, dejando correr el loading de 4 a 5 cm.
- 5.- El gel se sumerge en 200 ml de agua y se adicionó 3 μ l de bromuro de etidio (0.5 mg/ml), se agitó por 5 minutos; posteriormente el gel se lava para eliminar el bromuro de etidio en exceso.
- 6.- El gel se coloca sobre un transiluminador de luz UV para determinar la fluorescencia de la interacción ADN de doble hebra-bromuro de etidio, la determinación de los productos de amplificación se hace por comparación con un control anteriormente amplificado y genotipificado.
- 7.- Se fotografía el gel con el equipo "eagle eye" en presencia de luz UV.
- 8.- Se eligen las muestras que se someterán a la hibridación para la obtención de genotipos.

7.6.- HIBRIDACIÓN DE LOS 5 LOCUS AMPLIFICADOS CON LA METODOLOGÍA "REVERSO DOT-BLOT".

- 1.- Las tiras de nylon que contienen las sondas se rotulan para su identificación y se depositan en una charola de hibridación de 8 carriles.
- 2.- El ADN amplificado se desnaturaliza en el termociclador a 95°C durante 3-10 minutos.
- 3.- Se agregan 3 ml de solución hibridadora para cada tira que se encuentra en el pozo de la charola de hibridación.

- 4.- Se toman 20 μ l del material amplificado y desnaturalizado, inmediatamente se adicionan a las charolas de amplificación que contienen las tiras correspondientes de cada muestra marcada.
- 5.- Se coloca en un baño María con agitación integrada a 55°C y de 50-70 rpm durante 15 minutos.
- 6.- 5 minutos antes de finalizar la incubación se prepara la mezcla de la siguiente solución:

 N° de tiras por 3.3 ml de solución hibridizadora.

 N° de tiras por 27 μ l de enzima conjugada.
- 7.- Terminados los 5 minutos de incubación se desecha la solución y se seca la charola.
- 8.- Se lava por unos segundos con solución lavadora precalentada.
- 9.- Secar perfectamente.
- 10.- Se adicionan 3 ml de solución de la enzima conjugada preparada en el paso 6.
- 11.- Se incuba a 56°C por 5 minutos con agitación de 50-70 rpm.
- 12.- Se desecha la solución y se seca perfectamente.
- 13.- Se adicionan 5 ml de solución lavadora a cada una de las tiras para lavar, desechar y secar.
- 14.- Se adicionan 5 ml de la solución lavadora a cada una de las tiras, se incuba a 55°C por 12 minutos con agitación de 50-70 rpm.
- 15.- Se desecha la solución lavadora y se seca perfectamente la charola.

16.- Se adicionan 5 ml de solución lavadora a cada tira, se lava por varios segundos.

17.- Se desecha la solución lavadora y se seca perfectamente la charola.

7.7.- DESARROLLO DE COLOR EN LAS TIRAS.

18.- Se adiciona 5 ml de buffer de citratos a cada tira y se coloca en un agitador orbital, se agita por 5 minutos a temperatura ambiente.

19.- Durante este paso se prepara la solución reveladora de color como sigue:

No de tiras por 5 ml de buffer de citratos.

No de tiras por 5 μ l de H_2O_2 al 3%.

No de tiras por 0.25 ml de TMB.

20.- Se desecha el buffer de citratos y se seca perfectamente la charola.

21.- Se adicionan 5 ml de la solución reveladora de color en cada tira.

22.- Se agita de 20-30 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente, la charola se protege perfectamente de luz.

23.- Se sacan las tiras de la charola y se secan perfectamente observándose, los puntos azules que corresponden a los alelos.

24.- Se fotografian las tiras.

25.- Se obtienen los genotipos de los 5 loci.

CAPÍTULO VIII.- RESULTADOS

Se amplificaron las regiones polimórficas de los 5 loci del sistema polymarker en una muestra poblacional de 219 personas pertenecientes al Valle de México.

La ubicación de las regiones que se amplificaron se describen en la siguiente tabla :

TABLA 8.1.- Datos generales de los loci que integran el kit polymarker; (Perkin Elmer NoN808- 0094).

	LDLR	GYPA	HBGG	D7S8	GC
Localización cromosómica	19p (13.1-13.3)	4q (28 - 31)	11p 15.5	7q (22 - 31.1)	4q (11-13)
Producto amplificado por PCR en pb	214	190	172	151	138
Número de alelos	2	2	3	2	3

La tira de nylon donde se hibridó el producto amplificado por PCR se muestra en la siguiente figura :

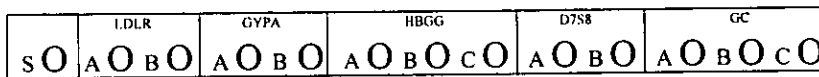


FIGURA 8.1.- Tira de nylon que tiene unidas las secuencias oligoespecíficas de cada alelo para cada locus del sistema PM; (Perkin Elmer No N808- 0094).

Donde S es el control de amplificación ubicado en el brazo corto del cromosoma número 6 en la región 21.3 perteneciendo al HLA DQ alfa.

Las tablas 8.2 presenta el número de alelos observados y las frecuencias alélicas de cada loci de polymarker en los 219 individuos originarios del Valle de México. En la figura 8.2 se grafican estos resultados.

TABLA 8.2.- Frecuencias alélicas observadas y frecuencias alélicas relativas observadas.

	<i>LDLR</i>	<i>GYPA</i>	<i>HBGG</i>	<i>D7S8</i>	<i>GC</i>
<i>A</i>	232 / 0.53	293 / 0.67	141 / 0.32	271 / 0.62	88 / 0.20
<i>B</i>	206 / 0.47	145 / 0.33	291 / 0.67	167 / 0.38	139 / 0.32
<i>C</i>	NO TIENE	NO TIENE	6 / 0.01	NO TIENE	211 / 0.48

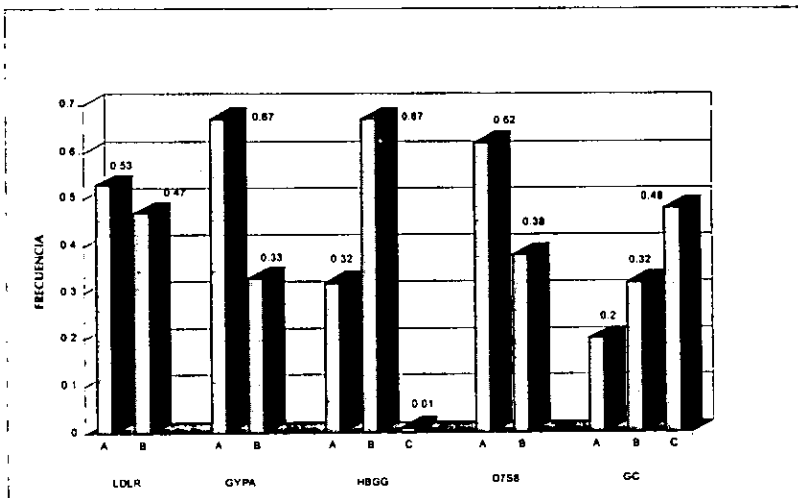


FIGURA 8.2.- Frecuencias alélicas relativas observadas en los 5 loci de P.M.

En la siguiente tabla se presentan las frecuencias genéticas observadas de cada loci de polymarker en los 219 individuos originarios del Valle de México (ver figura 8.3).

TABLA 8.3.- Frecuencias genéticas observadas, sistemas de 2 alelos.

	LDLR	GYPA	D7S8
AA	70	93	84
AB	92	107	103
BB	57	19	32

TABLA 8.3.- Continuación (sistemas de 3 alelos).

	HBGG	GC
AA	22	6
AB	92	30
AC	5	46
BB	99	17
BC	1	75
CC	0	45

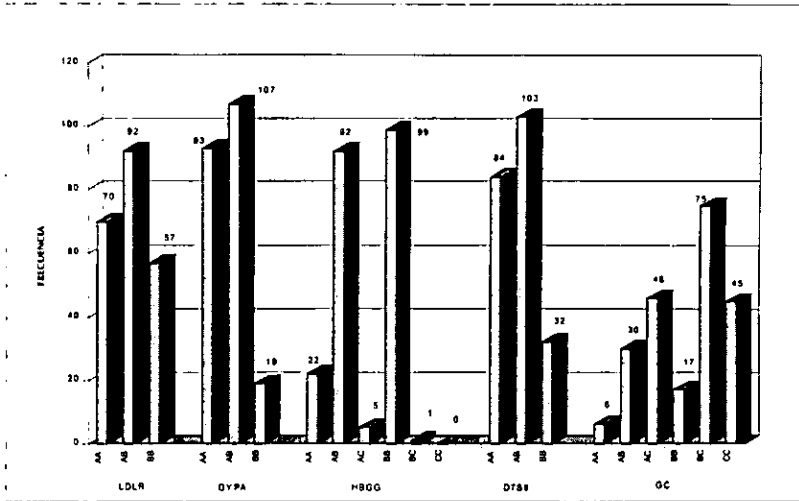


FIGURA 8.3.- Frecuencias genéticas observadas en los 5 loci de P.M.

CAPÍTULO IX.- TRATAMIENTO Y ANÁLISIS

La distribución alélica en el Valle de México se presenta en la siguiente tabla:

TABLA 9.1.- Distribución alélica en el Valle de México.

LOCUS	FRECUENCIA ALÉLICA (%)		
	A	B	C
LDLR	53	47	—
GYPA	67	33	—
HBCG	32	67	1
D7S8	62	38	—
GC	20	32	48

La distribución genética en el Valle de México se presenta en la tabla 9.2.

Con la frecuencia genética observada en cada locus se calcula la X^2 (chi cuadrada) para aceptar o rechazar la Hipótesis nula o H_0 (población en equilibrio de Hardy Weinber).

Para calcular X^2 (chi cuadrada) de cada genotipo se empleó la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum (n_{oi} - n_{ei})^2 / n_{ei}$$

Donde n_{oi} es la frecuencia del genotipo observado en la población y n_{ei} es la frecuencia genética esperada en la población. En la tabla 9.3 se presenta el χ^2 calculado para cada locus.

TABLA 9.2.- Distribución genética en el Valle de México.

GENOTIPO	FRECUENCIA GENÉTICA (%)				
	LDLR	GYP A	H BGG	D7S8	GC
AA	32	42	10	38	3
AB	26	—	42	—	14
AC	—	—	2	—	21
BB	42	49	45	47	8
BC	—	—	0.05	—	34
CC	—	9	0.0	15	20

TABLA 9.3.- Frecuencias genéticas observadas y frecuencias genéticas esperadas.

LOCUS LDLR		
Genotipo	Observado	Esperado
AA	70.00	61.32
AB	92.00	109.50
BB	57.00	48.18
χ^2 TOTAL		5.64

LOCUS GYP A		
Genotipo	Observado	Esperado
AA	93.00	98.55
AB	107.00	96.36
BB	19.00	24.09
χ^2 TOTAL		2.56

TABLA 9.3.- Continuación.

LOCUS HBGG		
Genotipo	Observado	Esperado
AA	22.00	22.43
AB	92.00	93.91
AC	5.00	1.40
BB	99.00	98.31
BC	1.00	2.93
CC	0.00	0.02
χ^2 TOTAL		10.60

LOCUS GC		
Genotipo	Observado	Esperado
AA	6.00	8.76
AB	30.00	28.03
AC	46.00	42.05
BB	17.00	22.43
BC	75.00	67.28
CC	45.00	50.46
χ^2 TOTAL		4.14

TABLA 9.3.- Continuación.

LOCUS D7S8		
Genotipo	Observado	Esperado
AA	84.00	85.41
AB	103.00	102.93
BB	32.00	30.66
χ^2 TOTAL		7.86×10^{-2}

$$X^2 \text{polymarker} = \sum X^2 \text{locus}(\text{LDLR} + \text{GYPA} + \text{HBGG} + \text{D7S8} + \text{GC}) = 23.0186$$

La hipótesis nula esta determinada por:

$H_0 = X^2 \text{ polymarker} \leq X^2_{\alpha} (\nu \text{ polymarker}, \alpha)$ = La población está en equilibrio con la ley de H.W.

La hipótesis alterna esta determinada por:

$H_u = X^2 \text{ polymarker} \geq X^2_{\alpha} (\nu \text{ polymarker}, \alpha)$ = La población **no** esta en equilibrio con la ley de H.W.

Donde ν indica los grados de libertad para el sistema polymarker y α determina el 5% de error.

Para calcular el X^2 en la tabla se tiene el siguiente intervalo de probabilidad:

Entre 0 y $X^2_{\alpha} (\nu \text{ polymarker}, \alpha)$, es decir que el X^2 de polymarker estará entre 0 y 26.2962 con 16 grados de libertad manteniendo un margen de error del 5%.

Si: $X^2 \text{ polymarker} \leq X^2_{\alpha} \Rightarrow H_0$ se acepta.

ó

$23.0186 < 26.2962, \Rightarrow H_0$ se acepta.

9.1.- CALCULO DE LA HOMOCIGOCIDAD Y HETEROCIGOCIDAD.

La frecuencia de homocigotos y la frecuencia de heterocigotos se obtienen de las frecuencias genéticas relativas observadas, mientras que los homocigotos esperados se obtienen de las frecuencias relativas observadas de cada loci por el número poblacional representativo.

$$H_0 \text{ esperada} = (1 - \sum X^2_i) (n / n-1)$$

La heterocigocidad esperada se obtiene del equilibrio de Hardy

Weinberg $H_e \text{ esperada} = 1 - H_0$.⁽⁴⁶⁾

En la siguiente tabla se presentan los valores de homocigotos y heterocigotos observados y esperados respectivamente.

TABLA 9.4.- Heterocigosidad + Homocigosidad = 1.

	<i>Ho Observada</i>	<i>He Observada</i>	<i>Ho Esperada</i>	<i>He Esperada</i>
LDLR	0.58	0.42	0.50	0.50
GYP A	0.51	0.49	0.56	0.44
H B G G	0.55	0.45	0.53	0.47
D 7 S 8	0.53	0.47	0.53	0.47
G C	0.31	0.69	0.67	0.33

9.2.- CÁLCULO EL PODER DE DISCRIMINACIÓN.

El poder de discriminación indica la capacidad de poder diferenciar a 2 individuos no relacionados en la población de estudio, los valores se obtienen de la sumatoria de los cuadrados de las frecuencias genotípicas observadas de cada marcador de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$P.D.\text{polymarker} = 1 - [(x^2 \text{ LDLR}) + (x^2 \text{ GYP A}) + (x^2 \text{ H B G G}) + (x^2 \text{ D 7 S 8}) + (x^2 \text{ G C})]$$

Los valores de discriminación están reportados en la tabla 9.5.

El poder de discriminación de todo el sistema polymarker es de 0.994772

9.3.- CALCULO DEL PODER DE COINCIDENCIA AL AZAR.

La probabilidad de que 2 individuos no relacionados pertenecientes a la misma población de estudio tengan el mismo genotipo se le conoce como el poder de coincidencia al azar o PCA.

TABLA 9.5.- Valores de discriminación.

MARCADOR GENÉTICO	GENOTIPO	GENOTIPO OBSERVADO	FRECUENCIA $n_i/219$	χ^2	PD = $\sum \chi^2$
LDLR	AA	70	0.319634	0.102166	0.346385
LDLR	AB	92	0.420091	0.176476	
LDLR	BB	57	0.260273	0.067742	
GYP A	AA	93	0.424357	0.180334	0.426575
GYP A	AB	107	0.488584	0.238714	
GYP A	BB	19	0.086759	0.007526	
HBGG	AA	22	0.100456	0.010091	0.396155
HBGG	AB	92	0.420091	0.176476	
HBGG	AC	5	0.022831	0.000521	
HBGG	BB	99	0.452054	0.204353	
HBGG	BC	1	0.004566	0.000020	
HBGG	CC	0	0.000000	0.000000	
D7S8	AA	84	0.383561	0.147119	0.389670
D7S8	AB	103	0.470319	0.221200	
D7S8	BB	32	0.146118	0.021350	
GC	AA	6	0.027397	0.000750	0.229165
GC	AB	30	0.136986	0.018765	
GC	AC	46	0.210045	0.044119	
GC	BB	17	0.077625	0.006025	
GC	BC	75	0.342465	0.117282	
GC	CC	45	0.205479	0.042221	

El PCA de polymarker se obtiene con la siguiente fórmula:

$$PCA = q(2-q)LDLR * q(2-q)GYPA * q(2-q)HBGG * q(2-q)D758 * q(2-q)GC$$

Donde q es el número de alelos observados por marcador.

En la siguiente tabla se muestran los PCA de cada locus.

TABLA 9.6.- PCA de cada locus.

MARCADOR	VALOR DE q	PCA
LDLR	1/2	0.375
GYPA	1/2	0.375
HBGG	1/3	0.177
D758	1/2	0.375
GC	1/3	0.177

$$PCA \text{ polymarker} = [1/2 (2-1/2)] * [1/2 (2-1/2)] * [1/3 (2-1/3)] * [1/2 (2-1/2)] * [1/3 (2-1/3)]$$

$$PCA \text{ polymarker} = 1.8 \times 10^{-3}$$

GENOTIPOS POSIBLES QUE SE PUEDEN OBSERVAR

El número de genotipos posibles por locus esta determinado por la siguiente ecuación:

$$G = (n^2 + n) / 2$$

Donde n es el número de alelos que contiene cada loci

En la siguiente tabla se reporte el número de genotipos posibles para cada loci.

TABLA 9.7.- Total de genotipos posibles.

MARCADOR	LDLR	GYPA	HBGG	D758	GC
GENOTIPOS TOTALES	3	3	6	3	6

Como el kit polymarker tiene 5 diferentes loci, entonces para observar todos los genotipos posibles se tiene un sistema de permutaciones sin repetición de n elementos tomados de r en r , es decir solamente se puede observar un genotipo por cada loci de:

$$\underline{3} * \underline{3} * \underline{6} * \underline{3} * \underline{6} = 972 \text{ posibles genotipos en el sistema de polymarker.}$$

CALCULO DEL CONTENIDO POLIMORFICO

La variabilidad de cada loci sobre la población de estudio esta determinado por el índice de contenido polimórfico o PIC.

El valor de PIC de cada loci se obtiene con un simple programa de cómputo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{PIC polymarker} = 1 - \sum P^2_i - \sum \sum P^2_i P^2_j$$

Donde P^2_i es la frecuencia alélica de i .

Donde P^2_j son las frecuencias alélicas relativas observadas en cada locus

En la tabla 9.8 se reportan las frecuencias relativas observadas en cada loci y en la siguiente tabla se reporta el valor de PIC por locus.

TABLA 9.8.- Índice de contenido polimórfico.

MARCADOR	LDLR	GYP A	HBGG	D7S8	GC
PIC	0.3741	0.3444	0.3565	0.3601	0.55346

CAPÍTULO X.- DISCUSIÓN

Los alelos A es más frecuente en la población de estudio en los locus LDLR, GYPA y D7S8 con el 53%, 67% y 62% respectivamente.

El alelo B es más frecuente en el locus HBGG con un 67%, posteriormente es el alelo A con el 32%, el de menor frecuencia es el alelo C con el 1%.

El alelo C es más frecuente en el locus GC con un 48%, mientras que el alelo B tiene una frecuencia de 32% y el de menor frecuencia es el alelo A con el 20%.

Los genotipos con mayor frecuencia son los AB en los locus LDLR, GYPA y D7S8 con un 42%, 49% y 47% respectivamente.

El genotipo más frecuente es el BB con un 45% en el locus HBGG, en seguida son los AB, AA, AC y BC con el 42%, 10%, 2% y el 0.05% respectivamente. El genotipo CC no se observó en la población de estudio.

En el locus GC el genotipo más frecuente es BC con un 34%, posteriormente son los AC, CC, AB, BB y AA con el 21%, 20%, 14%, 8% y 3% respectivamente.

Los genotipos homocigotos son más frecuentes que los genotipos heterocigotos en los locus LDLR, GYPA, HBGG y D7S8 ajustándose a una distribución binomial de acuerdo con el equilibrio de Hardy Weinberg a través del empleo de la chi cuadrada.

Debido a que la población del Valle de México está compuesta de subpoblaciones de diferentes estados de la República Mexicana y estos son el resultado de una unión al azar, entonces se esperaría un equilibrio donde los heterocigotos fueran mayores a los homocigotos, sin embargo Walhung establece que cuando se realizan

distribuciones genéticas de individuos elegidos al azar y estos provengan de diferentes subpoblaciones entonces la homocigocidad observada será superior o igual a la homocigocidad esperada en el equilibrio de Hardy Weinberg,⁽⁴⁶⁾ como los reportados en la tabla 9.4.

En el equilibrio de Hardy Weinberg el valor de heterocigotos presentes en cada locus no pueden exceder el 50% total de los genotipos comprendidos en la distribución binomial, si en caso dado fuese superior al 50%, entonces se estaría identificando un polimorfismo para ese locus; es decir que entre más heterocigotos presente un locus y este se aproxime a la unidad entonces cada individuo tendría su propia huella genética para ese locus.^(43, 46)

Al emplear la ecuación del índice de contenido polimórfico se justifica que los alelos del locus GC es el que presenta mayor variación genética, posteriormente son los alelos de los locus LDLR, D7S8, HBGG y GYPA como se muestra en la tabla 9.6.

Los 5 loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y CG que integran el kit polymarker son excelentes marcadores polimórficos en la identificación de personas en el Valle de México, donde la exclusión es mayor del 99% con la certeza que solamente 2 personas elegidas al azar en mil tengan el mismo genotipo, siempre y cuando estas 2 personas no tengan relación biológica entre ellas.

La cantidad de genotipos que se pueden observar en este marcador son de 972; sin embargo, en el Valle de México no se observó el genotipo CC en el locus HBGG, en consecuencia, sólo se tienen 810 posibles genotipos; y si el estudio se extiende a 1000, 2000 o un millón de personas con seguridad se observarán los 972 genotipos.

Con la distribución de las frecuencias alélicas como se observa en la tabla 10.1 se pueden diferenciar poblaciones y/o razas, ya que existe variación alélica y que son

muy frecuentes en una o algunas razas, la distribución de frecuencias alélicas sigue un patrón completamente diferente.

TABLA 10.1.- Frecuencias alélicas relativas de diferentes razas, (Perkin Elmer NoN808- 0094).

MARCADOR GENÉTICO	ALELO	I Caucásicos	II Afro-americanos	III Japoneses	IV Mexicanos
LDLR	A	0.448	0.235	0.202	0.53
	B	0.552	0.765	0.798	0.47
GYPA	A	0.530	0.527	0.517	0.67
	B	0.470	0.473	0.483	0.33
HBGG	A	0.537	0.439	0.331	0.32
	B	0.450	0.228	0.669	0.67
	C	0.013	0.333	0.000	0.01
D7S8	A	0.610	0.655	0.612	0.62
	B	0.390	0.345	0.388	0.38
GC	A	0.275	0.090	0.287	0.20
	B	0.178	0.720	0.471	0.32
	C	0.547	0.190	0.242	0.48

Las razas que están presentes en la tabla 10.1 el grupo I corresponden a los **caucásicos** de los E.U. considerándose como tronco único, el grupo II esta formado por la raza de color, la **afroamericana** que viven en los E.U. y son descendientes de padres de color, el grupo III esta formado por la raza **japonesa** siendo aquellos que residen en los E.U. y son descendientes de padres japoneses; mientras que el grupo IV esta formado por las personas que radican en el D.F., área Metropolitana y Estado de México siendo hijos de padres mexicanos.

En la comparación alélica de las 4 razas se observan las diferentes frecuencias.

- ⇒ Para el loci LDLR, el alelo A es muy frecuente en la raza mexicana y en la raza caucásica con una frecuencia del 53% y 44%, mientras que el alelo B es más frecuente en la raza japonesa y en la raza de color por presentar una frecuencia del 79% y 76% respectivamente.
- ⇒ Para el loci GYPA, el alelo A tiene mayor frecuencia en la raza mexicana ya que su frecuencia es del 67%, mientras que el alelo B tiene frecuencias semejantes en las razas japonesa, Afroamericana y caucásica del 47%.
- ⇒ Para el loci HBGG, el alelo A es muy frecuente en la raza caucásica y en la raza de color ya que presentan el 53% y el 44%, el alelo B es más frecuente en los mexicanos y en los japoneses por presentar frecuencias del 67%, el alelo C es totalmente predominante en la raza de color por presentar una frecuencia del 33% y pudiera ser que este alelo se haya integrado a otras razas ya que no son muy frecuentes.
- ⇒ En el loci D7S8, los alelos A y B tienen frecuencias similares en las 4 razas con frecuencias entre el 61% y el 38% respectivamente.
- ⇒ En el loci GC, el alelo A es muy frecuente en la raza japonesa, en la raza caucásica, y en la raza mexicana por presentar frecuencias del 28%, 27% y 20% respectivamente; pudiera ser que este alelo se haya integrado a la raza color ya que este alelo no es muy frecuente. El alelo B es muy frecuente en la raza de color pues su frecuencia es del 72%, mientras que el alelo C es más frecuente en la raza caucásica y en la raza de mexicana por presentar frecuencias del 54% y 48% respectivamente.

Con las frecuencias alélicas bajas de una raza o población se pueden determinar con gran exactitud la exclusión o no exclusión de un parentesco biológico como el ejemplo siguiente.

En el loci HBGG, el supuesto padre presentó un genotipo AC. La madre presentó un genotipo AA y el recién nacido presentó un genotipo AC.

Para este locus el padre es heterocigoto y tiene un valor de 0.5, para este loci la madre es homocigoto y tiene un valor de 1.0, el recién nacido es hijo del supuesto padre; pues heredo ambos alelos por segregación mendeliana; el alelo A proviene de la madre y el alelo C proviene del padre. Para saber exactamente que probabilidad existe de que esta persona sea el padre se realiza la siguiente operación:

$$IP = \varphi \sigma / \varphi \sigma_{FREC} = 0.5 / 0.01 = 50$$

Donde:

IP, es el índice de paternidad.

φ , es el genotipo de la madre.

σ , es el genotipo del padre.

σ_{FREC} , es la frecuencia observada del alelo en la población y que es segregado por el padre.

El % de paternidad está determinado por la ecuación modificada de Bayes⁽⁶⁾

$$W\% = IP \times 100 / (IP + 1)$$

Donde:

W%, es el % de paternidad.

El W% de paternidad es del 98.04% que es el padre y por lo tanto no se excluye.

Si el recién nacido RN tuviera un genotipo AB, entonces se excluiría el supuesto padre, ya que no es posible heredar el alelo B.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPÍTULO XI.- CONCLUSIONES

- ☑ El empleo de la tecnología de la PCR es altamente sensible, ya que se puede amplificar fragmentos o regiones polimórficas de ADN con cantidades mínimas de ADN genómico humano. Las regiones amplificadas que para este caso son polimórficas son identificadas por hibridaciones reverso dot - blot donde los oligonucleótidos específicos están fijados a una membrana nylon. La aplicación de estas 2 herramientas son útiles en el campo forense donde es muy frecuente encontrar muestras de fluidos y tejidos biológicos en cantidades pobres como son, manchas de sangre, manchas de semen, manchas de saliva, tejido parcialmente calcinado, tejido en parcial descomposición, fragmentos de tejido óseo y de un cabello que presenta raíz.

- ☑ Las frecuencias alélicas observadas en los 5 locus LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, y GC que integran el kit de amplificación polymarker de los 219 individuos pertenecientes al Valle de México están en equilibrio con la ley de Hardy Weinberg, lo que nos indica que las frecuencias alélicas permanecerán constantes a través de las generaciones.

- ☑ De los 5 loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, y GC que integran el kit de amplificación polymarker solamente el locus GC presentó mayor variabilidad alélica con un valor de PIC = 0.55346.

- ☑ La heterocigocidad total de los 5 loci que integran el kit de amplificación polymarker fue de 50.4%, muy por de bajo de la heterocigocidad de otros marcadores de amplificación empleados en el Valle de México como el que se propuso al principio de 75%. De los 810 posibles combinaciones para la formación de genotipos teóricamente se podrán observar 2 genotipos idénticos por cada 1,000 individuos elegidos al azar en el Valle de México con la exactitud del 99.47%.

- ☑ Con el empleo de un solo locus de polymarker que tenga una frecuencia alélica baja del 1% en la población, se obtendrán altos índices de exclusión en comparación con los antígenos del HLA (serológico), enzimas plasmáticas y grupos sanguíneos que solamente excluyen entre el 90, 15 y el 20%, respectivamente.

- ☑ La comparación de frecuencias alélicas entre diferentes razas ofrecen posibilidades para el entendimiento del origen de ciertas migraciones y en los cambios evolutivos en ciertas poblaciones.

- ☑ Las distribuciones genéticas y alélicas de los 5 loci de polymarker formarán parte del banco de datos para la identificación de personas, que en conjunto con los marcadores HLA DQ α y el D1S80 será más preciso el individualizar a una persona a través de su ADN genómico.

CAPÍTULO XII.- RECOMENDACIONES

- ⇒ Realizar muestreos por estratificados de por lo menos de 4 regiones (norte, sur, este, oeste) del Valle de México, para determinar si las distribuciones genéticas observadas de los heterocigotos son mayores de los homocigotos y a través de las frecuencias alélicas se podrá saber si en realidad la población Mexicana es muy heterogénea de acuerdo al principio de Walhund.
- ⇒ Realizar estudios de genética poblacional en grupos indígenas en nuestro país, con el fin de determinar si el alelo C de loci HBGG es una incorporación por parte de la raza Afroamericana a las diferentes razas.
- ⇒ Existen muchos loci exónicos de 3 y 4 alelos que se han ubicado y secuenciado, que se pueden evaluar en la población Mexicana para que posteriormente se construya un kit semejante al de polymarker donde se incluyan a los loci más polimórficos.
- ⇒ Emplear otros marcadores intrónicos de tipo VNTR's que son más polimórficos, que se encuentran en el mercado, que se amplifican por PCR y que se genotifican por comparación de peso molecular en gel de poliacrilamida.

REFERENCIAS.

- 1.- Reynolds R, Sensabaugh G, Blake E. Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 1991; 63: 1-14.
- 2.- Balasz Ivan, Dirección General de los Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del D.F., Octubre de 1996.
- 3.- Vázquez T. E. C.; Estudio comparativo de los sistemas tradicionales y automatizado de huellas dactilares en la procuraduría general de justicia del Distrito Federal; Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias penales, México D. F. 1994
- 4.- Moreno G. R.; Notas de un criminalista. México: Porrúa, 1991
- 5.- Berumen C. J.; El análisis del ADN en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo* 1993; 108: 34-41.
- 6.- Bowden J. H., Sheltans S., Mifflin T. E.; Aguideto DNA fingerprinting. *Clinical Chemistry News* 1994: 20-25
- 7.- Emery A.E., Mueller R. P.; *Genética médica*. España: Churchill Livingstone, 1992.
- 8.- Russell P. J.; *Lecture notes in genetic*. Great Britain: Black Well, 1980: 2-4
- 9.- Wallace R., King J., Sanders G.; *Biología molecular y herencia*. México: Trillas, 1991.
- 10.- Karp G.; *Biología celular*. México: Mc GrawHill, 1987.
- 11.- Lehninger A. L.; *Bioquímica*. 2a ed. España: Omega, 1990

-
- 12.- Borel, Randoux, Moquart y cols; Bioquímica dinámica. Argentina: Panamericana, 1989
 - 13.- Solari A.J.; Genética humana. Argentina: Panamericana, 1996.
 - 14.- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A.; Bioquímica de Harper. México: Manual moderno, 1994
 - 15.- Salamanca F.; Citogenética humana. México: Panamericana, 1990
 - 16.- Flouler J. C. S., Burgoyne L. A., Scott A. C. y cols; Repetitive desoxirribonucleic acid (DNA) and human genome variation a concise review relevant to forensic biology. *Journal of Forensic Sciences* 1988; 33: 1111-1126
 - 17.- Ochoa S., Ieloir L. F., Oró J. y cols; Biología molecular integral. México: Limusa, 1979
 - 18.- Brain Ch., Sniegowski p., Stephan W.; The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994; 371: 215-220
 - 19.- Guizar V. J.; Genética médica. 2a ed. México: Manual moderno; 1994
 - 20.- Sosa M., Criminalística, Tomo I. México: limusa; 1993
 - 21.- Franco DAM. Hematología forense. 2a. ed. México: Editorial Porrúa, 1991
 - 22.- Artur L. Beaudet Ch. R., Scriver W. S. y cols; Introduction to human biochemical and molecular genetics. U.S.A.: Mc Graw Hill, 1990
 - 23.- Lisker R., Pérez B. R., Granados J. y cols. Gene frequencies and admixture estimates in a México city population. *American Journal of Physical Antropology* 1986; 71: 203-207.

-
- 24.- Lisker R., Ramírez E., Pérez B. R. y cols. Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban center. *Human Biology* 1990; 10: 791-801.
- 25.- Dodd B. E.; DNA finger printing in matters of family and crime. *Nature* 1985; 318: 506-507.
- 26.- Budowle B., Linsey J. A., Decou J. A. y cols. Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and GC (PM loci), and HLA DQ alpha usin a multiplex amplification and typing procedure. *Journal of Forensic Sciences* 1995; 40: 45-54
- 27.- Gill P. Jeffreys A. J., Werrett D. J.; Forensic aplication of DNA "fingerprints". *Nature* 1985; 318: 577-579
- 28.- Lisker R., Armendares S.; Introducción a la genética humana. México: Manual moderno, 1994
- 29.- Davies K. E., Read A. P.; Molecular basis of inherited disease. 2a ed. Great Britain: IRL Press; 1992
- 30.- Jeffreys A. J., Wilson V., Neumann R. y cols. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: DNA fingerprinting of single cell. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 10953-10971
- 31.- Knight B.; Medicina forense de Simpson. México: Manual moderno; 1994
- 32.- Barrera S. H. A., Ortiz L. R., Rojas M. A. y cols; Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo* 1993; 108: 50-60
- 33.- Mc Pherson M. J., Quirke P. Taylor G. R.; PCR a practical approach, Volume I. Great Britain: IRL Press, 1994
-

-
- 34.- Erlich HA. PCR technology principles and applications for DNA amplification. United States of America: Editorial Stockton press; 1989: 7-31, 209-224.
- 35.- AmpliType User Guide version 2. Perkin Elmer 1992.
- 36.- AmpliType HLA DQ alpha PCR Amplification and Typing Kit. Perkin Elmer; Part No N808- 0056.
- 37.- AmpliType PM + DQA1 PCR Amplification and Typing Kit. Perkin Elmer; Part No N808- 0094.
- 38.- Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson C. H. y cols; Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proceedings National Academy of Science U.S.A.1989; 86: 6230-6234
- 39.- AmpliFLP D1S80 PCR Amplification Kit. Perkin Elmer; Part No N808- 0054.
- 40.- Sajantila A., Budowle B., Ström M. y cols. PCR amplification of alleles at the D1S80 locus: comparison of a Finnish a north american caucasian population sample, and forensic casework evaluation. American Journal Human Genetic 1992; 50: 816-825.
- 41.- Budowle B., Baechtel F. S., Smerick J. y cols. D1S80 population data in americans, caucasians, southeastern hispanics, southwestern hispanics, and orientals. Journal of Forensic Sciences 1995; 40: 38-44.
- 42.- Croose C. A., Schumm J.; Investigation of species specificity using nine PCR-based human STR systems. Journal of Forensic Sciences 1995; 40: 952-956
- 43.- León de Garay A.; Genética de poblaciones y evolución. México: Textos UAP, 1988.

-
- 44.- Milton J. S., Tsokos J. O.; Estadística para biólogos y ciencias de la salud. España: Mc Graw Hill, 1991
- 45.- Lisker R. Estructura genética de la población mexicana, aspectos médicos y antropológicos. México: Salvat, 1981.
- 46.- Berumen C. J, Casas AL, Hernández MA y cols. Diversidad genética de tres sondas de ADN en la huella digital de ADN de una población mexicana. Revista de Investigación Clínica 1994; 46: 457-464.
- 47.- Lewontin R. C, Hartl DL. Population genetics in forensic DNA typing. Science 1991; 254: 1745-1750.
- 48.- Higuchi R., Beroldingen C. H., Sensabaugh G. F. y cols; DNA typing from single hairs. Nature 1988; 332: 543-546
- 49.- Hedrick P. C., Genetics of populations. USA: Jones and Bartlett, 1985
- 50.- Levy, G. L.; Black and white and gray. American Laboratory 1997; 29: 6 - 8.

ANEXO A**A.1.- REACTIVOS.**

1.- Sacarosa tritón 2 X.	Concentración final.
219 g de sacarosa.	0.64 M
2.42 g Tris base.	0.02 M
2.03 g MgCl ₂	0.01 M
20 ml Tritón X-100	2 %

Disolver todos los reactivos anteriores en aproximadamente 500 ml de agua DD (Destilada Desionizada) contenida en un vaso de precipitados de 1 Lt. Ajustando el pH de la solución a 7.6 usando HCL 6 N. Vaciar la solución a un matraz volumétrico de 1 Lt y aforar con agua DD. La solución es estable por 3 meses a 4° C.

2.- Buffer Lysis de Núcleos pH 8.2	Concentración final
1.21 g de Tris base	10 mM
23.4 g NaCl	400 mM
0.75 g Na ₂ EDTA	2 mM

Disolver los reactivos anteriormente mencionados en 800 ml de agua DD en un vaso de precipitados de 1 Lt. Ajustar el pH de la solución a 8.2 usando HCL 6 N. Vaciar la solución a un matraz volumétrico de 1 Lt y aforar con agua DD. La solución es estable por 6 meses a temperatura ambiente.

3.- SDS al 20 % (Dodecil Sulfato de Sodio).

200 g de Lauril Sulfato de Sodio (SDS). Disolver el reactivo en 800 ml de agua DD en un vaso de precipitados de 1 Lt. Calentar si es necesario hasta la disolución completa del SDS. Llevar la solución a un matraz volumétrico de 1 Lt. y aforar con agua DD. La solución es estable por 6 meses a temperatura ambiente.

4.- Proteinasa K (5 mg / ml).

100 mg de proteinasa K. Disolver la enzima en 10 ml de agua DD. Estos 10 ml se transfieren a un matraz de 25 ml y se agregan otros 10 ml de agua DD. Dispensar la solución anterior en alícuotas de 0.5 ml y almacenarlos a -20° C. La enzima es estable durante 6 meses.

5.- Solución saturada de cloruro de sodio

NaCl 350 g. Agregar alrededor de 350 g de NaCl en aproximadamente 1 Lt de agua destilada. Disolver lo más que se pueda hasta que precipite la sal y forme una capa, entonces se obtendrá una solución saturada de NaCl.

6.- Tris 1 M pH 8.0

121.1 g de TRIS base.

Disolver el TRIS base en aproximadamente 500 ml de agua DD en un vaso de precipitados. Ajustar el pH a 8.0 usando aproximadamente 70 ml de HCl al 6 N. Aforar en matraz volumétrico de 1 Lt usando agua DD. La solución es estable por 6 meses a 4° C.

7.- EDTA 0.5 M pH 8.0

190.1 g de Na_4 EDTA. Disolver la sal en aproximadamente 500 ml de agua DD en un vaso de precipitados y ajustar el pH a 8.0 y aforar en un matraz volumétrico de 1 Lt con agua DD. La solución es estable por 6 meses a 4° C.

8.- BUFFER TE.

1.0 ml de TRIS 1 M (reactivo No 6).

0.02 ml de EDTA 0.5 M (reactivo No 7).

Mezcle 1 ml de TRIS 1 M y 0.02 ml de EDTA en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua DD. La solución es estable por 6 meses a 4°C.

9.- ETANOL al 96%

Guarde a temperatura ambiente.

10.- ETANOL al 70 %

370 ml de etanol al 95 %

Agregar 370 ml de etanol al 95 % a un matraz aforado de 500 ml y afore con 130 ml de agua DD. Guarde la solución a -20° C.

11.- HCl 6N.

250 ml de HCl concentrado.

Agregar el ácido en 250 ml de agua DD. Evitar el contacto con la piel o inhalarlo.

12.- NaOH 0.1N.

2.0 g de NaOH. Los 2 g de NaOH se disuelven en aproximadamente en 200 ml de agua DD, tener cuidado al disolver el NaOH hay desprendimiento de calor. Se afora en un matraz de 500 ml con agua DD.

13.- Buffer TAE 20 X.

TRIS base	96.6 g
Ácido acético glacial	22.8 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	40 ml

Todos los reactivos se mezclan y posteriormente se afora en un matraz volumétrico de 1 L con agua DD.

14.- Acetato de Amonio 7 M

3.96 g de Acetato de Amonio. Disolver el reactivo con agua DD y aforar a 100 ml etiquetar y guardar.

15.- Bromuro de Etidio.

500 mg de Bromuro de Etidio.

Disolver el reactivo con agua DD y aforar a 100 ml, **se debe de tener mucho cuidado** ya que el Bromuro de Etidio es **una sustancia mutagénica**. La solución debe de almacenarse en un frasco ámbar y en refrigeración.

16.- BUFFER-DE CARGA (LOADING BUFFER)

50 % de glicerol.

20 mM TRIS-HCl de pH 8.0

10 mM de EDTA de pH 8.0

0.2 % de azul de bromofenol.

Se mezclan los reactivos y se guardan en refrigeración.

17.- FENOL / CLOROFORMO / ALCOHOL ISOAMÍLICO.

Una vez destilado el fenol (sustancia corrosiva), tenerlo fundido a 65° C y llevarlo a un embudo de separación, agregando 200 mg de 8-hidroxiquinoleína y mezclar.

Agregar un volumen igual del TRIS 1 M de pH 7.5, mezclar y dejar que las 2 fases se separen.

Separe la fase acuosa de la fase orgánica y deje en el embudo la fase orgánica, agregue al fenol un volumen igual de TRIS 0.01 M de pH 7.5 y mezcle, deje que las fases se separen. Siga haciendo lavados hasta que el pH sea de 7.5 en la fase acuosa.

Mezcle el fenol, con un volumen igual de cloroformo más 4 ml de alcohol isoamílico. Cubra la solución con buffer TRIS 0.01 y almacene a 4° C.

18.- AGAROSA.

Agarosa para análisis de ADN genómico y para producto de PCR

19.- AGUA DESTILADA Y DESIONIZADA.

20.- HIELO TIPO FRAPPÉ.

21.- ESTÁNDARES DE ADN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES: 5, 10, 15, 20, 30 Y 50 mg/ml

22.- BUFFER LISIS DE CÉLULAS.

Contiene Sacarosa, $MgCl_2$ y Tritón X-100. Se adquiere comercialmente.

23.- BUFFER LYSIS DE PROTEÍNAS.

Contiene Na_2EDTA y $NaCl$. Se adquiere comercialmente.

24.-DITRIOTRIETOL DTT 0.039 M.

Una cantidad de 0.06g de DTT se disuelven en 10 ml de agua DD, se guardan en alícuotas de 1 ml en tubos ependorf de 1.5 ml de capacidad y en refrigeración.

25.- KIT FORENSE POLYMARKER

AmpliType PM PCR Amplification and Typing Kit.

Componentes del Kit.

Mezcla de reacción PCR AmpliType PM: tubo con mezcla de reacción que contiene: AmpliTaq DNA Polimerasa, $MgCl_2$, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, y buffer salino. Almacenar de (2-8)°C.

"Primer" AmpliType PM: son 2 tubos conteniendo cada uno: 12 "primers" en buffer salino. Almacenar de (2-8)°C.

Los 12 primers que lo forman son: 2 para **LDLR**, 2 para **GYP A**, 2 para **HBGG**, 2 para **D7S8**, 2 para **GC** y 2 para **DQ α** que sirve como control de amplificación de origen humano.

Control positivo de DNA: tubo que contiene ADN genómico humano con una concentración de 100 ng/ml. Con un genotipo: **BB**, **AB**, **AA**, **AB**, **BB**. Para los loci **LDLR**, **GYP A**, **HBGG**, **D7S8** y **GC** respectivamente. Almacenar de (2-8)°C.

Aceite mineral: frasco gotero. No exponer a la luz UV. Almacenar de (2-30)°C.

Tiras con sondas de DNA para AmpliType PM: 50 tiras, las tiras son de nylon donde se encuentran pegadas las sondas específicas para cada alelo del AmpliType PM. Proteger de la luz UV.

Enzima conjugada HRP-SA: tubo que contiene suero de caballo con Streptoavidina-Peroxidasa, disuelta en buffer.

Cromógeno TMB: frasco que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Disolver en 30 ml de etanol absoluto.

Protocolo: para amplificación de AmpliType PM en el termociclador 480, así como la forma de hibridizar y de interpretar los resultados

A.2.- MATERIAL.

- 1.- Microtubos de 0.5 y 1.5 ml.
- 2.- Pipetas Pasteur de vidrio.
- 3.- Pipetas de plástico tipo Pasteur con bulbo de 0.5 y 2.0 ml.
- 4.- Tubos de polipropileno (Falcon) con tapón de rosca de 15 y 50 ml
- 5.- Puntas para pipetas tipo *Gilson* para dispensar volúmenes de 1 a 20, de 40 a 200 y de 200 a 1000 ul (microlitros).
- 6.- Pipetas tipo *Gilson* para volúmenes variables de 1 a 20, de 40 a 200 y de 200 a 1000 ml.

-
- 7.- Peines de 12 y 20 dientes y de 0.1 y 0.2 mm respectivamente, para hacer micropozos en los geles.
 - 8.- Recipiente de plástico de 11x14 cm.
 - 9.- Nivelador de burbuja.
 - 10.- Probetas de 100, 250, 500 y 1000 ml
 - 11.- Vasos de precipitados de 50, 250, 500 y 1000 ml
 - 12.- Matraz Erlenmeyer de 50, 250, 500 y 1000 ml
 - 13.- Matraz aforados de 100, 500 y 1000 ml
 - 14.- Frasco ámbar con tapón de rosca de 150, 200 y 500 ml
 - 15.- Pizetas de 150, 200 y 500 ml
 - 16.- Guantes de látex desechables de tamaño mediano y grande.
 - 17.- Maskintape.
 - 18.- Diurex.
 - 19.- Cinta testigo.
 - 20.- Rollos de papel tipo polaroid K65H.
 - 21.- Pliegos de papel filtro.
 - 22.- Jeringas de 3, 5 y 10 ml
 - 23.- Gradillas para microtubos de 0.5 y 1.5 ml
 - 24.- Gradillas para tubos de 15 y 50 ml

25.- Recipientes de plástico de 2.5 cm de altura X 17.5 cm de ancho X 23 cm de largo, con 8 canales de 1.5 cm de ancho X 14 cm de largo; y con su respectiva tapa para hibridizar.

26.- Rollos de papel estraza.

27.- Perillas de succión con seguridad.

28.- Filtros milipore de 25, 35 y 45 mm .

29.- Marcadores de tinta permanente.

30.- Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 ml

31.- Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml

A.3.- EQUIPO.

1.- Baño María con control de temperatura de 30-100° C, con precisión de 0.1 grados.

2.- Centrífuga con control de temperatura de 4 a 90° C, precisión de un grado y hasta 12 mil r.p.m., cabezales intercambiables para microtubos de 1.5, 15 y 50 ml

3.- Parrilla de calentamiento con control de temperatura y agitación integrada.

4.- Microcentrífuga para tubos de 1.5 y 50 ml y de 14 mil r.p.m.

5.- Baño María con control de temperatura, con precisión de 0.1 grados y agitación integrada hasta 100 r.p.m.

- 6.-Agitador orbital, plataforma orbital de 40 X 40 cm y regulador de 0-500 r.p.m.
- 7.- Cámara de electroforesis horizontal, para geles de 14X11 y 24.5X20 cm
- 8.- Fuente de poder con regulador para miliamperes y regulador de 0 a 900 voltios.
- 9.- Termociclador (modelo 9600, *PERKIN-ELMER*) con programas ajustables para amplificar.
- 10.- Horno de microondas.
- 11.- Transiluminador de luz ultravioleta.
- 12.- Sistema de fotografía tipo polaroid (*STRATAGENE, EAGLE EYE*).
- 13.- Potenciómetro con electrodo de Calomel para mediciones de pH de 0-14.
- 14.- Refrigerador con intervalo de temperatura de 2 a 18° C.
- 15.- Congelador (-20°C).
- 16.- Máquina para elaborar hielo tipo frappé.
- 17.- Campana de flujo laminar.
- 18.- Hibridizador.
- 19.- Termobloque (intervalo de temperatura de 25° a 110° C.)
- 20.- Bloques de aluminio para el termobloque y con hoyos de 1.5 cm de diámetro para tubos de 1.5 ml
- 21.- Balanza analítica con precisión de 0.0001 gramos.
- 22.- Balanza semianalítica con precisión de 0.1 gramos.

GLOSARIO

RFLP = Fragmentos de restricción de longitudes polimórficas.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

LDRL = Receptores de lipoproteínas de baja densidad.

GYPA = Glicoferrina A.

HBGC = Hemoglobina gama-globina.

D7S8 = Locus ligado con el gen de la fibrosis quística.

GC = Componente específico de grupo.

PD = Poder de discriminación.

PCA = Índice de contenido polimórfico.

ICP = Índice de coincidencia al azar (PIC).

HLA DQ α = Complejo principal de histocompatibilidad en la región Dqalfa.

ALELO = Forma alternativa de un gen.

A-T = Unión entre adenina y citocina por puentes de hidrógeno.

C-T = Unión entre guanina y citocina por puentes de hidrógeno.

CsCl = Cloruro de cesio.

XX = Nomenclatura genética para determinar al sexo femenino.

XY = Nomenclatura genética para determinar al sexo masculino.

ARN = Ácido ribonucleico.

VNTR's = Variaciones en número de repeticiones en tándem.

SSO = Oligonucleótidos de secuencias específicas.

S = Cepa lisa de pneumococos.

R = Cepa rugosa de pneumococos.

N¹⁴ = Nitrógeno en forma natural.

N¹⁵ = Isótopo de nitrógeno.