



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO
PARA LA IDENTIFICACIÓN HUMANA
CON FINES DE EXCLUSIÓN DE
PATERNIDAD”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MIGUEL ÁNGEL LEÓN TAPIA



DIRECTORA DE TESIS:
Dra. MARTHA LEGORRETA HERRERA.

2009



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.

DEDICATORIA

A mis padres:

Sra. Ma. Juana Tapia Velázquez.

Sr. Miguel Ángel León Robles.

A quienes que con sacrificios, gusto y satisfacción me han brindado en todo momento su apoyo y su enorme interés en darme educación por sobre todas las cosas.

A mis hermanos:

Iván León Tapia.

Luís Alberto León Tapia.

Adrián David León Tapia.

A quienes pretendo darles el mejor ejemplo que pueda.

A la memoria de mi tío Rolando León Robles (1978-2008).

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo y al financiamiento del proyecto PAPIME PE204105, de Promega Corporation y de la QFB Lourdes Vega Navarrete del Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas ANIGEN.

Quisiera agradecer a la UNAM por todo lo que me ha dado y de la que siento tanto orgullo.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera por haberme aceptado en su laboratorio, por su confianza, por haber sido parte esencial en mi formación académica, sus enseñanzas y por toda la ayuda recibida para poder realizar y concluir esta tesis.

A la QFB Lourdes Vega Navarrete y a Promega por todos los diferentes tipos de apoyo para este proyecto, tiempo, invitación a su laboratorio, comentarios y enseñanzas que fueron necesarias para la elaboración y enriquecimiento de este proyecto.

A la Dra. Catalina Machuca Rodríguez y al M. en C. Ernesto Mendoza vallejo por sus aportaciones, paciencia, interés, estímulo durante la preparación y finalización de este proyecto, por su honestidad y buen humor.

A mis sinodales: Dra. Lucila Álvarez Barrera, Dra. María del Carmen García Rodríguez y Dr. Juan José Rodríguez Mercado por las revisiones, observaciones, comentarios, críticas y sugerencias hechas para enriquecer este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio Sureyma, Vicky y Rodrigo, así como a Diana Carolina López Osorio y Dora Villegas Carmona del Centro de Estudios e Investigaciones Genéticas ANIGEN por su ayuda y compañerismo.

A mis grandes amigos de la FES Zaragoza: Cindel, Karina, Sandra, Ana, Jonathan, Gela, Itzel, Misa, Juan, Rebeca, Elizabeth, Cristina, Iliá, Keyla, Reyna, Jovani, Charly, Héctor, Lulú, Alicia, Edith, Irán, a los pulkers: Cristian, Isaac, Saúl, Yahir, Raymundo, Álvaro, Emilio, Carmen, Oscar y a todos aquellos que se escapan de mi memoria. Quienes con su forma de ser única influyeron de una u otra forma en algún aspecto de mi vida.

Finalmente quiero expresar mi mas sincero agradecimiento y gratitud a TODAS aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis, aportando, sugerencias, ideas y correcciones a este manuscrito.

A todas ellas, “MUCHAS GRACIAS”.

Atentamente.

M. Ángel León Tapia.

“La verdadera ciencia
enseña, sobre todo, a dudar
y a ser ignorante.

Es detestable esa avaricia
espiritual que tienen los
que sabiendo algo, no
procuran la transmisión de
esos conocimientos”.

Miguel de Unamuno

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	5
BASES BIOLÓGICAS: LA CÉLULA	5
Teoría celular	5
Estructura celular	5
Compartimientos celulares	6
Núcleo	6
Estructura bioquímica del ADN	8
Replicación celular y herencia	9
Herencia Mendeliana	10
Clasificación de las secuencias de nucleótidos	11
Estructura del genoma humano	12
Equilibrio de Hardy-Weinberg	15
MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN HUMANA	16
Extracción de ADN	16
Cuantificación de ADN	18
Métodos para el análisis de polimorfismos genéticos de interés forense	19
Análisis de <i>VNTRs</i> mediante <i>RFLP</i>	19
Análisis de <i>STRs</i> mediante PCR	22
Análisis de otros marcadores de ADN	26
ADN mitocondrial	26
Análisis de polimorfismos <i>SNPs</i>	27
Valoración de la prueba de paternidad	28
Exclusión de paternidad	28
No exclusión de paternidad	29
Valoración estadística	29
4. OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31

5. HIPÓTESIS	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS	33
Estandarización del protocolo	33
Extracción de ADN	33
Cuantificación del ADN	34
Amplificación de los STRs	34
Separación electroforética	36
Tinción	36
Pruebas de paternidad	37
Extracción de ADN	38
Amplificación	38
Separación electroforética	38
Tinción	38
7. RESULTADOS	39
Estandarización del protocolo	39
Determinación de las condiciones óptimas del gel	39
Determinación de la concentración óptima de ADN en la amplificación	43
Pruebas de paternidad	47
Índice de Paternidad (IP)	49
Índice Combinado de Paternidad (ICP)	50
Probabilidad de Paternidad (PP)	50
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	57
10. REFERENCIAS	58
11. APÉNDICES	64
Apéndice 1 – Preparación de la mezcla de reacción	64
Apéndice 2 – Preparación de la solución de carga	64
Apéndice 3 – Preparación del gel de poliacrilamida	65
Apéndice 4 – Frecuencias alélicas de la población de Hispano-América	66

1. RESUMEN

Las instituciones encargadas en la administración de justicia se caracterizan por los rápidos y profundos cambios en las metodologías aplicadas en la resolución de un hecho delictivo con una gran dependencia respecto a los desarrollos tecnológicos, en la actualidad para garantizar una correcta comparación de resultados interlaboratorio, la comunidad forense ha realizado un enorme esfuerzo para la estandarización no solo de las técnicas de análisis sino también de los marcadores a utilizar, nomenclatura y valoración estadística de los resultados. En este proceso han intervenido diversas organizaciones principalmente de Estados Unidos, Europa e Hispanoamérica. El objetivo fundamental de los laboratorios forenses es examinar indicios con el fin de obtener toda la información que ayude a solucionar las interrogantes sobre un hecho o un acto criminal, así como examinar la relación de parentesco que exista entre un individuo y otro, fundamentando veraz y eficazmente los resultados que se obtengan. Este tipo de identificación se basa en el análisis directo del material genético ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante la utilización de técnicas como el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De tal manera que se decidió realizar un estudio que permitió estandarizar los diferentes protocolos para la identificación humana, mediante 11 STRs, para la asignación de la paternidad utilizando la técnica de PCR múltiple y la resolución de los amplicones en geles de acrilamida teñidos con bromuro de etidio, evitando el uso de costosos equipos como el secuenciador.

El ADN se obtuvo mediante los métodos de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y en tarjetas de papel FTA. El ADN se utilizó para amplificar 11 STRs mediante la técnica de PCR. Se identificaron los alelos presentes en las muestras mediante observación visual de las bandas presentes en un gel de poliacrilamida y se compararon con el patrón alélico comercial de Promega.

El proceso de estandarización también consistió en analizar las condiciones en la mezcla de PCR para lograr una amplificación óptima. Después de realizar diversos ensayos con diferentes concentraciones de ADN se logró establecer que la cantidad mínima de ADN que se requiere para obtener resultados confiables es de 7 ng y 1 disco de 1.2 mm de papel FTA por muestra

en un volumen de reacción de 12.5 µl. Posteriormente se evaluaron las condiciones del corrimiento electroforético y de la preparación del gel de poliacrilamida. Los fabricantes recomendaban geles desnaturalizantes del tamaño de los de secuenciación (aproximadamente 60 x 90 cm x 0.4 mm) mismos que requieren cámaras de electroforesis especiales así como una mayor cantidad de reactivos, por lo que fue necesario modificar las dimensiones del gel, la concentración de acrilamida, el tiempo del corrimiento electroforético y el voltaje requerido para cada una de las 11 regiones a amplificar. Los mejores resultados se obtuvieron en geles no desnaturalizantes de 16 x 16 cm x 0.75 y 0.5 mm y de 16 x 20 cm x 0.75 y 0.5 mm a una concentración de acrilamida del 8% y un tiempo de electroforesis que va desde 90 a 130 minutos dependiendo de la región amplificada a 300 V y 40 mA. Para visualizar el patrón de bandas obtenido con los controles fue necesario también calibrar la técnica de tinción. Originalmente se utilizó la descrita por el fabricante (tinción de plata) que además de requerir reactivos sumamente tóxicos y costosos, involucraba demasiadas horas en el proceso. Por lo anterior se procedió a probar modificaciones en esa tinción además de la de bromuro de etidio por lo que fue necesario correr la electroforesis en condiciones no reductoras.

Una vez que fue posible detectar cada uno de los STRs de forma adecuada se dió por terminado el proceso de la estandarización y se probó esta técnica en dos tríos (constituídos por el supuesto padre, la madre y el hijo), en donde se tenía alguna duda sobre el parentesco del hijo con su padre. Esta técnica permitió analizar los 11 microsátélites que generaron el perfil genético de cada individuo. Además se realizó un análisis estadístico de los resultados en el que se utilizó la frecuencia alélica de la población de Hispanoamérica para calcular la probabilidad de paternidad para cada caso. Los resultados obtenidos fueron mayores del 99.999 % lo que indica el poder de individualización que poseen los microsátélites en conjunto.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una adecuada estandarización de la técnica dado que se optimizó el uso de reactivos, se redujo el costo y el tiempo en la electroforesis, además que con las modificaciones realizadas se reducen notoriamente los desechos tóxicos y lo mas importante es que se mejora la detección de los resultados, lo que permite diferenciar un individuo de cualquier con otro y adjudicar la paternidad con un nivel de confianza extraordinariamente alto.

Palabras clave: genética forense, identificación humana, prueba de paternidad, microsátélites, STRs, PCR.

2. INTRODUCCIÓN

Con anterioridad al desarrollo de las técnicas moleculares, la identificación de un individuo solo se podía realizar mediante el empleo de tatuajes, caravanas o mediante descripciones fenotípicas. De la misma manera, la determinación de la paternidad debía resolverse de acuerdo al parecido fenotípico entre los supuestos padres y el hijo (Giovambattista *et al.*, 2001).

Al comienzo del siglo XX, Landsteiner inició el camino de la identificación mediante marcadores genéticos, al evidenciar la existencia de polimorfismos en los grupos sanguíneos humanos, ya que no todas las personas poseen el mismo tipo de glóbulos rojos. Así, por primera vez, los individuos se podían agrupar sobre la base de un criterio objetivo y se acuñó el término “marcador genético” (Landsteiner, 1900). Luego de varias décadas se incorporaron nuevos tipos de marcadores genéticos, como polimorfismos proteicos correspondientes al sistema de histocompatibilidad, polimorfismos bioquímicos, entre otros, pero fue hasta la década de los ochenta cuando se generaron las técnicas de análisis del ADN que permitieron analizar los polimorfismos presentes (Giovambattista *et al.*, 2001).

En los últimos años los constantes avances científicos y técnicos han tenido un profundo impacto en el desarrollo de las pruebas. La dactiloscopia, la balística, la criminalística, la documentoscopia, etc., son ejemplos de esta proyección de los conocimientos científicos en el campo policial y judicial. Los avances han sido particularmente espectaculares en el ámbito de la biología molecular. En concreto, lo que se denomina genética forense (Gascón, 2007).

La genética forense estudia básicamente las regiones de ADN que presentan variabilidad entre los distintos individuos, es decir, estudia regiones polimórficas del ADN. Así, analizando un determinado número de estas regiones se puede lograr la identificación de individuos y en otros casos adjudicar la paternidad (Entrala, 2000).

Actualmente en muchos países, particularmente de América Latina, la criminalidad organizada y la violencia callejera dejan cada vez mas victimas y desaparecidos. En otros casos, como conflictos armados, atentados terroristas, catástrofes producidas por fenómenos naturales o accidentes de tránsito el análisis de ADN se puede utilizar para identificar un individuo fallecido o para excluir falsos positivos de identificación humana (González *et al.*, 2005). Por otro lado,

esta prueba es por mucho, mas frecuente y mas solicitada en estudios de paternidad, la razón mas común es para determinar la paternidad aunque existen otras situaciones donde establecer la relación biológica es importante, tales como las preferencias dadas a inmigrantes, problemas con herencias y seguimiento de transplantes (González *et al.*, 2005).

En México se ha iniciado el camino de la genética, en particular la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, por medio de su departamento de genética forense, es el órgano judicial que ha empezado a aplicarla, aunque en la actualidad existen diversos laboratorios particulares que se dedican principalmente a elaborar pruebas de paternidad. Dicho departamento se creó en 1990. Así mismo, la colaboración internacional con Estados Unidos ha sido sumamente activa, por medio del FBI, esto es principalmente para la elaboración de un banco de datos de frecuencias alélicas de los marcadores utilizados dentro de la población mexicana (Fragoso, 1999).

La comunidad genético forense ha realizado un enorme esfuerzo para la estandarización no solo de las técnicas de análisis sino también de los marcadores a utilizar, su nomenclatura y la valoración estadística de los resultados para garantizar una correcta comparación de los resultados interlaboratorio. El fruto de este esfuerzo es que hoy en día existe un reconocimiento internacional de la genética forense como una de las disciplinas científicas con niveles mas altos de estandarización en las técnicas utilizadas y criterios de análisis (Farfán, 2006).

Así, el presente proyecto desarrolla la estandarización de la prueba de identificación humana con énfasis en las pruebas de paternidad mediante marcadores moleculares STRs individuales utilizando material y equipo común de biología molecular para proveer resultados estadísticamente confiables y permitir estudios posteriores con estos marcadores.

3. MARCO TEÓRICO

BASES BIOLÓGICAS: LA CÉLULA

Teoría celular.

Como resultado de las pequeñas dimensiones de las células, el estudio de sus propiedades tuvo que esperar al desarrollo del microscopio. En 1665, Robert Hooke describió por primera vez el descubrimiento de las células; realizó sus observaciones al examinar una rebanada de corcho muy delgada, Hooke observó el aspecto en forma de panal de abejas del corcho, y utilizó el término célula para describir los compartimientos que vio. Muy pronto, muchos de los contemporáneos de Hooke fueron capaces de observar una gran cantidad de diferentes tipos de células vegetales y animales. En 1838, Mathias Schleiden publicó los resultados de sus investigaciones en plantas y concluyó que las plantas estaban formadas por células y que el embrión de una planta se deriva de una célula única. Theodor Schwann publicó en 1839 un trabajo más inteligible sobre las bases celulares de la vida animal; también propuso que todos los tejidos estaban formados por células y todavía fue más lejos: concluyó que todas las células de plantas y animales eran las unidades funcionales de los organismos vivos (Karp, 1987).

Estructura celular

Todos los organismos vivos están formados por células, éstas se organizan en conjuntos cooperativos denominados tejidos, que a su vez se asocian formando grandes unidades funcionales denominadas órganos (Alberts *et al.*, 2002). El tamaño promedio de las células eucariotes es de 10-100 μm , y se subdividen en zonas limitadas por membranas simples o dobles llamadas organelos, las cuales se encuentran en una sustancia amorfa y homogénea coloidal denominada citoplasma, con una gran cantidad de membranas y partículas bañadas en una sustancia citoplasmática nombrada citosol granular. Los organelos presentan una compleja organización interna y llevan acabo actividades fisiológicas especializadas complicadas además de no funcionar de manera aislada (Figura 1) (Karp, 1987; Callen, 2000; Alberts *et al.*, 2002).

Compartimientos intracelulares

La membrana plasmática rodea a la célula, definiendo su extensión y manteniendo las diferencias esenciales entre el contenido de la célula y su entorno. En todas las células, la membrana plasmática esta formada por moléculas lipídicas y proteicas. Las moléculas lipídicas son anfipáticas; es decir, tienen porciones hidrofílicas e hidrofóbicas, éstas están compuestas en forma de una doble capa continua de unos 5 nm de grosor. Las proteínas están asociadas a las membranas de diferentes maneras y actúan como sensores de señales externas, permitiendo que la célula cambie en respuesta a indicaciones ambientales; estas proteínas sensoras, o receptores, transfieren información, en lugar de iones o de moléculas, a través de la membrana (Alberts *et al.*, 2002; Karp, 1987).

Las mitocondrias ocupan una parte sustancial del volumen citoplasmático de las células eucariotas (Figura 1-A), generan la mayor parte de la energía en forma de ATP por medio de varias reacciones (ciclo de Krebs) que se utiliza para desplazar las reacciones biosintéticas que requieren un aporte de energía libre. Dentro de la matriz, las mitocondrias contienen moléculas de ácido desoxirribonucleico o ADN y ribosomas, de tal manera que, son capaces de sintetizar proteínas (Avers, 1991; Robertis *et al.*, 1978).

Núcleo

El núcleo es un compartimiento celular contenido en el citoplasma en una posición central, y su forma puede ser variable; redondo, oval, elíptico, etc. y ocupa un 10% del volumen celular (Alberts *et al.*, 2002; Jiménez-Merchant, 2003). En la estructura nuclear, el orgánulo más visible es el nucleolo además de diversas masas de cromatina que corresponden a determinadas regiones de los cromosomas, tanto el nucleolo como los cromosomas se encuentran en una masa fluida carente de estructura denominada nucleoplasma (Figura 1-B) (Brown-Bertke, 1979). El nucleolo es el sitio de síntesis y procesamiento y del ensamblado de las subunidades del ribosoma. Internamente consta de centros fibrilares, está constituido por los genes y proteínas que forman parte del ribosoma. La cromatina es el material cromosómico compactado durante la interfase, de forma amorfa y aparece aleatoriamente disperso en ciertas partes del núcleo, sin embargo no toda la cromatina de cada núcleo tiene el mismo estado de compactación (Nelson-Cox, 2005). La cromatina que se encuentra en forma muy compacta se le denomina

heterocromatina del que existen dos tipos: la facultativa y la constitutiva, mientras que el resto del material cromosómico está en forma extendida constituyendo la eucromatina. La heterocromatina facultativa corresponde a regiones que pueden estar activas en algunos tipos celulares o inactivas en otros dentro del mismo organismo. Con respecto a su distribución en el genoma, puede tener secuencias de uno de los miembros de un par alélico, o bien, estar todo el cromosoma condensado, mientras que el otro miembro del par puede no formar parte de cúmulos compactos semejantes. La heterocromatina constitutiva se encuentra siempre en ambos miembros de un par en todas las células del organismo y esta formada por secuencias repetidas abundantemente, como son las regiones del cromosoma cercanas al centrómero (Jiménez-Merchant, 2003; Hicks, 2006). En su forma más simple, la cromatina consiste en fibras que contienen proteínas y ADN en aproximadamente las mismas masas, con una pequeña cantidad de ARN (Nelson-Cox, 2005; Hicks, 2006).

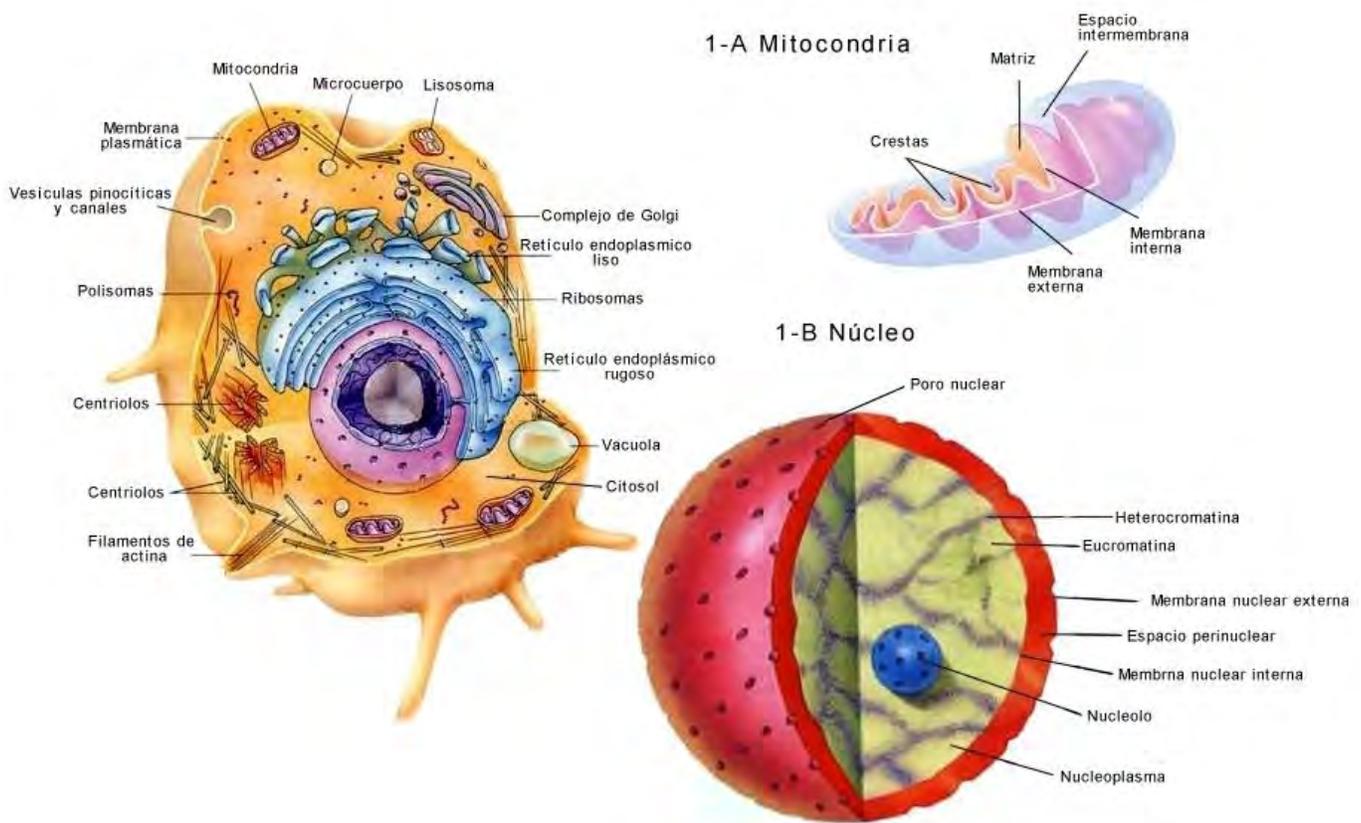


Figura 1. Estructura celular; A – Mitocondria, B – Núcleo.

Estructura bioquímica del ADN

Las células contienen varias moléculas de gran peso molecular o macromoléculas, como son los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas macromoléculas pueden clasificarse como polímeros; es decir, moléculas que tienen una unidad estructural que se repite muchas veces. Los ácidos nucleicos son de dos clases: ácido desoxirribonucleico o ADN y el ácido ribonucleico o ARN (Jiménez-Merchant, 2003). El descubrimiento de la estructura del ADN comenzó en 1953, cuando James D. Watson y Francis H. C. Crick propusieron correctamente la estructura doble helicoidal, sobre la base del análisis de los patrones de difracción de rayos X, junto con una cuidadosa construcción del modelo (Lodish *et al.*, 2003).

La molécula de ADN está constituida por tres componentes característicos: una base nitrogenada cíclica, un monosacárido aldehídico tipo pentosa y un ácido fosfórico. Las bases nitrogenadas derivan de los compuestos purina; adenina (A) y guanina (G) y pirimidina; citosina (C) y la timina (T). La pentosa es la 2'-desoxi-D-ribosa o desoxirribosa (Figura 2) (Hicks, 2000).

La unión de la base nitrogenada con la desoxirribosa forma un nucleósido; éste, uniéndose al ácido fosfórico constituye un nucleótido. Los nucleótidos se unen para formar el polinucleótido, en el cual el grupo fosfato en posición 5' de la desoxirribosa se une por enlace covalente fosfodiéster con el hidroxilo 3' de la desoxirribosa del nucleótido vecino, y así sucesivamente (Nelson-Cox, 2001). La estructura secundaria del ADN es una hélice de giro a la derecha formada por dos hebras de polinucleótidos orientadas en sentido antiparalelo; es decir, el extremo 5' de una hebra queda frente al extremo 3' de la otra (Figura 2-A). Las dos hebras se unen por puentes de hidrógeno que se establecen de manera específica o complementaria entre las bases de las dos hebras. Una molécula de adenina se une, por dos puentes de hidrógeno, a una timina; y una de guanina se une por tres a una de citosina (Figura 2, B) (Jiménez-Merchant, 2003; Hicks, 2000; Lodish *et al.*, 2003).

Normalmente, las moléculas de ADN se encuentran en las células organizadas en estructuras compactas, en las que la hélice se encuentra bajo una fuerte tensión estructural, generado principalmente por la interacción de proteínas con carga positiva, básicas, llamadas histonas y algunas proteínas no histonas las cuales empaquetan y ordenan el ADN (Jiménez-Merchant, 2003; Nelson-Cox, 2005).

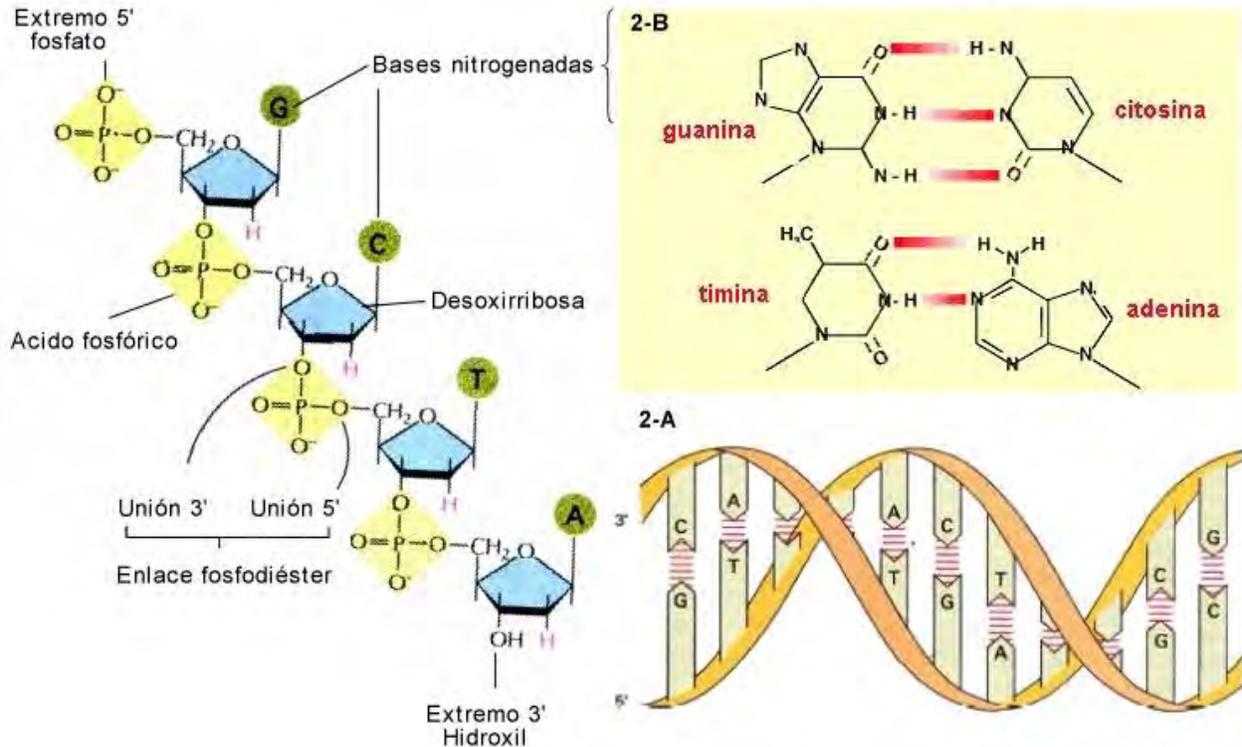


Figura 2. Estructura bioquímica del ADN; A - Estructura secundaria, B – Bases nitrogenadas. Basado en Alberts *et al.*, 2002.

Replicación celular y herencia

La división celular, mitótica, es el mecanismo fundamental por el cual todos los organismos duplican sus células. Sin embargo, la mayoría de los organismos eucariotes poseen un modelo alternativo, meiótico, de transmisión cromosómica; este modo está inevitablemente acoplado a una fase sexual en su ciclo vital en la cual el material genético de dos progenitores distintos llegan a residir en una única célula (Goodenough, 1981). Los ciclos sexuales de vida incluyen dos fases alternantes en las cuales el número de cromosomas en una es el doble del que corresponde a la otra; una fase diploide $2n$, y una haploide n (Avers, 1991). Específicamente, la meiosis representa la vía por la cual se reduce a la mitad el número de cromosomas de una célula y se especializa para la fusión sexual (gameto) a partir de células diploides en los tejidos germinales. Estas células pasan por una replicación típica en la interfase, una vez completada, el núcleo meiótico pasa por una secuencia de etapas de profase, metafase, anafase y telofase que constituyen la primera división meiótica o *meiosis I*. En la cual, los conjuntos homólogos de

cromátidas hermanas en lugar de separarse, se aparean formando una estructura denominada bivalente, y en la anafase los dos homólogos duplicados (cada uno de ellos formado por dos cromátidas hermanas) se separan. A consecuencia de esto, cada célula hija recibe dos copias de uno de los dos homólogos. La interfase siguiente suele ser breve, sin embargo en ésta no se produce ninguna replicación del ADN cromosómico. Los dos núcleos producidos en la *meiosis I* pasan por todas las etapas de profase, metafase, anafase y telofase en la segunda división meiótica o *meiosis II*, lo que origina cuatro núcleos, cada uno de los cuales es haploide en el número de cromosomas. Así, la meiosis da lugar a una distribución completamente al azar de los cromosomas en los gametos, por esta razón la formación de los gametos es la base física de las nuevas combinaciones del material hereditario que ocurren en cada generación (Alberts *et al.*, 2002; Avers, 1991; Goodenough, 1981).

Herencia Mendeliana

G. Mendel definió en 1865 las leyes básicas de la transferencia de la información genética. El trabajo de Mendel, basado en la hibridación de plantas, fue fundamental para determinar el concepto de gen, utilizó como modelo experimental a cepas puras de plantas de chícharo (*Pisum sativum*) para estudiar las leyes de la herencia (Jiménez-Merchant, 2003).

Una célula diploide contiene dos cromosomas homólogos de cada tipo que derivan cada uno de un gameto masculino y de uno femenino durante un proceso sexual, el conjunto completo de cromosomas de un organismo se denomina genoma. La posición física que ocupa una determinada secuencia de ADN, como puede ser un gen, en el cromosoma se denomina locus, a cada una de las formas alternativas que ocupan un locus se le denomina alelo, un organismo con dos alelos idénticos en un locus dado se dice que es homocigótico, mientras que un organismo con alelos distintos se dice que es heterocigótico (Farfán, 2006),

Durante la *meiosis I*, los cromosomas homólogos y los centrómeros de cada bivalente se alinean por encima y por debajo de la placa de la metafase y se segregan en la anafase, cuando un heterocigoto experimenta meiosis, la segregación de los cromosomas homólogos determina que las células haploides producidas contengan un alelo dado, pero nunca ambos; este fenómeno se denomina *principio de segregación* y a menudo *primera ley de Mendel*. Una excepción a la generalización de que los alelos se segregan en la anafase de la *meiosis I* surge

en la formación de quiasmas y en el intercambio genético (entrecruzamiento) en cualquier punto entre el locus de los dos alelos en cuestión y el locus del centrómero en donde no se segregan hasta la anafase de la *meiosis II*, en la cual los centrómeros se dividen y las cromátidas se separan (Goodenough, 1981).

El principio de segregación es válido para los cromosomas homólogos, los cuales se disponen en el ecuador de la metafase de la *meiosis I* de una manera independiente y permanecen independientes a lo largo de la meiosis. El resultado de ello es que los alelos que están situados en los cromosomas no homólogos (no ligados) experimentan una distribución independiente durante la meiosis. Una célula con un par de cromosomas homólogos que presentan dos alelos (A y a), un segundo par de cromosomas homólogos podría tener un par distinto de alelos (B y b). Puesto que los homólogos se distribuyen independientemente, la probabilidad determina que un cuarto de todas las células haploides resultantes de la meiosis contengan los alelos A y B, un cuarto A y b, un cuarto a y B y un cuarto a y b. Este resultado se denomina *principio de la distribución independiente* y representa la *segunda ley de Mendel* (Goodenough, 1981; Winchester, 1985).

Clasificación de las secuencias de nucleótidos

La estructura de un determinado ADN está definida por la secuencia de las bases nitrogenadas en la cadena de nucleótidos. El orden en que aparecen las cuatro bases a lo largo de una cadena en el ADN es crítico para la célula, ya que constituye las instrucciones del programa genético de los organismos (Alberts *et al.*, 2002; Farfán, 2006; Sirchia *et al.*, 1996; Lorente *et al.*, 1994).

El ADN puede ser de dos tipos según su función, el codificante y no codificante. El ADN *codificante*, esta formado por los fragmentos que contienen la secuencia primaria de los aminoácidos de las proteínas sintetizadas por ellos, a esta secuencia de nucleótidos que codifica para un producto de ARN y se le denomina gen (Lorente *et al.*, 1994). El otro tipo de ADN es el llamado *no codificante*, regiones a las cuales no se les atribuye ninguna producción de proteínas, a estas secuencias también se les llama ADN de desecho, pero se cree que tienen alguna función reguladora que no esta completamente entendida (Coello *et al.*, 2001).

Existen tres tipos de ADN *no codificante*; las regiones intergenéticas, las regiones intragenéticas y los pseudogenes. Las regiones intergenéticas son las porciones de ADN que se encuentran entre los genes, se sabe que algunas porciones de regiones intergenéticas regulan la expresión de los genes adyacentes a ellas, pero otras no tienen ninguna función conocida. Las regiones intragenéticas, también llamadas intrones, son segmentos de ADN encontrados dentro de los genes, éstos se transcriben a ARN junto con el resto del gen, pero se remueven del ARN antes de la traducción, a los segmentos restantes se les denominan exones. Un pseudogen es un segmento de ADN que es similar a un gen funcional, pero que contiene cambios de nucleótido para prevenir su transcripción o traducción (Coello *et al.*, 2001; Mattick, 2004).

Estructura del genoma humano

Un ser humano está compuesto por un promedio de aproximadamente 100 billones de células, donde la mayoría contiene toda la información genética. El genoma nuclear diploide humano consiste en 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales, X e Y, en conjunto cada célula somática contiene 46 cromosomas. El genoma humano está constituido por 3,000 millones de pares de bases. Sólo el 2% del ADN humano es codificante, se calcula que existen de 28,000 a 80,000 genes según los diferentes métodos que se utilizan para su estimación (Makalowski, 2001), mientras el 98% restante forma parte del ADN no codificante. Es en este ADN donde se concentra la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos (Farfán, 2006). Se ha estimado que dos genomas humanos, escogidos al azar, difieren aproximadamente en uno cada 500 nucleótidos, si el genoma humano contiene 3×10^9 pares de bases, existen entonces, 6×10^6 bases diferentes entre dos personas (Lennie, 1999). Así, todos los individuos de la especie humana son idénticos entre sí en un 99.98% y sólo el 0.02% residen las diferencias entre unos y otros y hacen a cada individuo único, a excepción de los gemelos univitelinos (Farfán, 2006; Lennie, 1999; Lorente *et al.*, 1994).

El genoma humano nuclear extragenómico está constituido por secuencias únicas y repetidas que pueden estar altamente, moderadamente o poco repetidas constituyendo cerca del 50% del genoma (Näslund *et al.*, 2005). Existen subgrupos de secuencias repetidas, el ADN repetitivo disperso y el ADN repetitivo en tándem (Figura 3). El ADN repetitivo disperso, que constituye el 15-20% de genoma, consiste en secuencias intercaladas, distribuidas en diferentes puntos del

genoma, y repetidas en tándem que pueden ser cortas y largas, generalmente representadas por *SINEs* y *LINEs*, los elementos dispersos cortos o *SINEs* (del inglés short interspersed nuclear element) tienen menos de 500pb de longitud y se encuentran hasta 500, 000 de ellos en el genoma, los elementos dispersos largos o *LINEs* (del inglés long interspersed nuclear element) en la familia L1 del humano tienen 6,400pb de longitud y se estima que existen unos 40, 000 en el genoma (D'Aiuto, *et al.* 2003; Makalowski, 2001; Arian, 1999; Venter *et al.*, 2001; Otieno *et al.*, 2004).

El otro subgrupo que representan aproximadamente el 10% del genoma, son las secuencias repetidas en tándem, que constituyen un ADN altamente variable (Lennie, 1999). Este ADN está constituido por secuencias cortas y que se repiten en tándem, es decir, de manera continúa una al lado de la otra, un cierto número de veces. Estos segmentos se subdividen de acuerdo a la cantidad de pares de bases (pb) que forman la unidad de repetición como:

- ADN *satélite* constituido por secuencias de más de 100 pb, concretamente estas secuencias constituyen la heterocromatina constitutiva que se acumula en los centrómeros y regiones subteloméricas principalmente (Venter *et al.*, 2001; Makalowski, 2001).
- ADN *minisatélite*, también se denomina repeticiones en tándem de número variable o *VNTR* (del inglés variable number of tandem repeats), constituido por secuencias de entre 7-100 pb, con un tamaño total de entre 500 y 10,000 nucleótidos, en su mayor parte se encuentran concentrados en las regiones teloméricas de los cromosomas y se han identificado 157,549 *VNTRs* en el genoma humano (Näslund *et al.*, 2005; Hakan-Rannug, 2006; Makalowski, 2001; Philippe, 2003).
- ADN *microsatélite*, o *STR* (del inglés short tandem repeats), formado por secuencias entre 2-6 pb, su tamaño varía entre 100 y 500 nucleótidos, principalmente se encuentran en los intrones y en las regiones intergenéticas, contribuyen a la organización de la cromatina en el núcleo y en cromosomas mitóticos. Se ha calculado que existen cerca de 300,000 *STRs* en el genoma (Subirana-Messeguer, 2008; Sharma *et al.*, 2007; Christiakov *et al.*, 2006; Makalowski, 2001).

Las regiones de ADN nuclear más importantes en genética forense son los *VNTRs* y *STRs* debido a que reúnen todas las condiciones que se exigen para que un marcador genético se pueda utilizar; ubicación cromosómica establecida, frecuencias de aparición óptimas, herencia mendeliana, distribución de alelos en la población, mutación conocida y no influenciados por causas externas (Vallejo, 2006).

Estos marcadores poseen una alta mutabilidad, como el ADN no codificante es el de mayor proporción, existe una mayor probabilidad de que las mutaciones se presenten en esas zonas, principalmente por errores en el desdoblamiento de la doble cadena y sus subsecuentes errores durante la replicación de ADN, la reparación o la recombinación (Sharma *et al.*, 2007; Christiakov *et al.*, 2006; Hakan-Rannug, 2006; May *et al.*, 2000; Levinson-Gutman, 1987). Como estas mutaciones se producen en las regiones no codificantes no están sometidas a una presión de selección tan importante como en las mutaciones que se producen en los genes, se acumulan a lo largo de la evolución por lo que sufren una gran variación en el número de repeticiones de su secuencia, originando un gran número de variantes o alelos (Narkuti *et al.*, 2007; Sirchia *et al.*, 1996; Pastore *et al.*, 1996; Jeffreys *et al.*, 1985; Edwards *et al.*, 1991). Cuando, dentro de la población, una región del ADN presenta más de dos variantes distintas se le denomina polimórfica. A cada uno de estos loci o segmentos de ADN polimórfico se les denomina marcador genético (Farfán, 2006).

Existen dos tipos de polimorfismos, los de *secuencia* y los de *longitud*. Los de *secuencia* por el que los alelos de un mismo locus se diferencian en la base presente en una o más posiciones concretas. Los de *longitud*, los alelos de un locus se diferencian entre ellos por el número total de bases que lo componen. El polimorfismo de longitud es muy común en las secuencias repetidas en tándem, en las que el número total de unidades de repetición definen a cada alelo (Farfán, 2006; Vallejo, 2006).

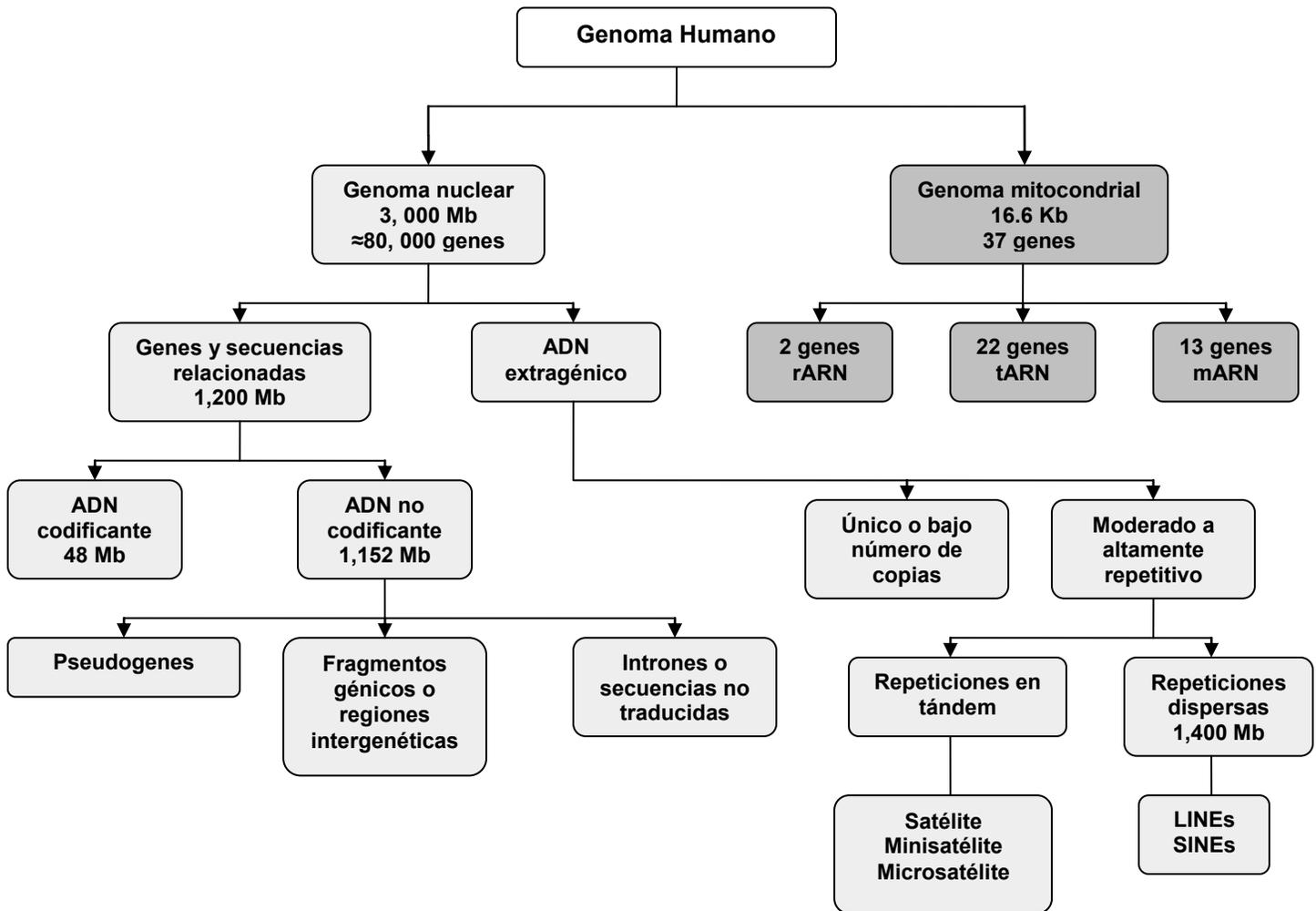


Figura 3. Estructura del genoma humano. Basado en Venter *et al.*, 2001.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Una de las principales áreas de investigación en genética de poblaciones es el desarrollo de una teoría cuantitativa que defina las leyes que gobiernan las estructuras genéticas de las poblaciones naturales. Esta rama tuvo sus raíces en las publicaciones de 1908 de G. Hardy y W. Weinberg, quienes consideraron el comportamiento de los loci en poblaciones idealizadas o poblaciones mendelianas, debido al comportamiento Mendeliano de los alelos (apareamiento al azar, población genéticamente estática) en donde se puede definir la frecuencia de cada alelo (Iniesta *et al.*, 2005).

En una población idealizada todos los gametos constituyen un único patrimonio genético y las diversas frecuencias alélicas son probabilidades. Suponiendo un único locus en el que existen solo dos alelos A y a, p es la frecuencia de A y q la de a, entonces $p + q = 1$. Entonces se puede considerar la probabilidad de que dos gametos se unan para formar un cigoto, la probabilidad de producir un homocigoto AA está dado por p^2 , análogamente la probabilidad de producir un homocigoto aa es q^2 . Finalmente la probabilidad de producir un heterocigoto es igual a $pq + qp = 2pq$, entonces la multiplicación de estas frecuencias da como resultado $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. La aplicación de esta fórmula a la genética de poblaciones se ha denominado Ley de Hardy y Weinberg o equilibrio de Hardy-Weinberg.

La expresión es importante ya que permite calcular la frecuencia de los alelos, definida como p y q , o la frecuencia de los genotipos, dada como $p^2 + 2pq + q^2$, para poblaciones idealizadas. Unas de las razones por la cual la población puede desviarse del equilibrio de Hardy-Weinberg son que los individuos de la población puedan no cruzarse al azar formando pequeños grupos reproductivamente aislados; la población no pueda ser estática o incluso puedan verificarse ambos fenómenos a la vez (Goodenough, 1981; Iniesta *et al.*, 2005).

MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN HUMANA

Extracción de ADN

Para aislar los ácidos nucleicos en estado natural se requiere de mucho cuidado en la eliminación de enzimas hidrolíticas, así como evitar la contaminación bacteriana, además de emplear maniobras o técnicas químicas y físicas muy poco agresivas (Minch, 1989; Hammes-Hooper, 2000; Darling-Brickell, 1994).

El ADN nuclear está presente en todas las células del cuerpo humano, excepto en los eritrocitos debido a que carecen de núcleo, por lo que es posible extraerlo a partir de cualquier material biológico: sangre, saliva, semen, pelos con raíz, huesos, tejidos, etc. así como de cualquier vestigio que pueda contener algún resto biológico; colilla de cigarro, sello, chicle, cepillo de dientes, ropa usada (Farfán, 2006; Kochl *et al.*, 2005). La selección de las muestras a analizar, su toma y recogida, identificación y conservación son factores de vital trascendencia en cualquier análisis de ADN (Farfán, 2006).

Existen diferentes técnicas de extracción del ADN, dependiendo de la naturaleza del material biológico. No se puede extraer igual cantidad de ADN de todos los tipos de muestras, existe un rango de variación de rendimiento en la extracción entre unas y otras (Tabla 1). Las principales etapas del aislamiento de los ácidos nucleicos por métodos convencionales son: destrucción de la célula por choque osmótico; homogeneización; digestión enzimática o ataque mecánico leve (Rapley, 2000; Gonzáles, 1988; Saremi *et al.*, 2008).

Generalmente, el método más común es el de fenol-cloroformo. Puesto que los ácidos nucleicos se unen muy fuertemente a los cationes y las proteínas catiónicas como histonas y protaminas, es necesario separarlos de estas sustancias con lesiones mínimas de la cadena polinucleotídica. Para esto se utilizan soluciones acuosas de fenol adicionadas de detergentes y agentes quelantes. Esta mezcla disolvente, añadida a los fragmentos de tejido, produce un sistema de dos fases; los ácidos nucleicos quedan en la fase acuosa y las proteínas desnaturalizadas se disuelven en el fenol o precipitan en la interfase. La separación de los ácidos nucleicos y las proteínas, se facilita por la adición de detergentes aniónicos y de sales concentradas. También se añaden agentes quelantes para eliminar metales polivalentes que podrían formar sales con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Finalmente, se trabaja en un pH ligeramente alcalino para reducir las interacciones electrostáticas de los ácidos nucleicos con otros iones (Kochl *et al.*, 2005; Rendina, 1974; Minch, 1989; Jiménez, 2004).

En algunas muestras las cantidades de ADN son extremadamente bajas y la calidad muy pobre, debido a una degradación, por lo que se han propuesto diferentes formas de tratar las muestras dependiendo del estado en que se encuentren (Gonzáles *et al.*, 2005; Côté *et al.*, 2008; Franke *et al.*, 2008).

Por tal motivo y por la creciente necesidad de homogenizar protocolos de análisis y acreditación de los laboratorios de genética forense, se trabaja con un conjunto de soluciones y materiales dispuestos en cajas comerciales denominadas kits. Por ejemplo existen metodologías comerciales de extracción diferencial de ADN con resina magnética, para muestras con espermatozoides y epitelios vaginales para casos de violación (Differex), FTA Whatman para muestras de referencia consistentes en sangre y saliva; Chelex o DNA IQ para muestras en las que se presume que el soporte contiene inhibidores (sangre, semen o saliva en tierra), Tissue

and hair extraction kit para la extracción de ADN de bulbos de folículos pilosos (Promega, 2008; Whatman, 2008).

Tabla 1. Contenido de ADN en diferentes muestras biológicas. Tomado de Gonzáles *et al.*, 2005.

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD DE ADN DISPONIBLE	CONSERVACIÓN
Sangre líquida Sangre en soportes	20 a 40 µg/ml 250 a 500 ng/ml	Refrigerar a 4° C Secar al ambiente y guardar en sólidos (manchas) bolsas de papel
Hisopado vaginal o rectal	250 a 500 ng/ml	Secar y guardar en un tubo estéril al ambiente
Semen líquido	150 a 300 µg/ml	Refrigerar a 4° C
Semen en frotis postcoital	10 a 3,000 ng/ml	Refrigerar a 4° C
Pelo con bulbo arrancado	1 a 750 ng/bulbo	Al ambiente
Saliva	1 a 10 µg/ml	Secar y guardar en bolsas de papel al ambiente
Frotis bucal	1 a 1.5 µg/ml	Secar al ambiente y guardar en bolsas de papel
Orina	1 a 20 ng/ml	Congelar a – 4° C
Huesos (según condiciones)	3 a 10 ng/mg de hueso	Limpiar y guardar en bolsas de papel
Fluido amniótico	65 ng/ml	Congelar a – 4° C
Vellosidad corial	8 µg/mg	Congelar a – 4° C
Hígado	15 µg/mg	Congelar a – 4° C
Músculo	3 µg/mg	Congelar a – 4° C

Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN aislado es una fase importante en un análisis, un error en la medición puede resultar en el fracaso de los resultados. EL ADN se cuantifica usando técnicas de espectroscopia por absorción, ésta se basa en la absorción de luz de las moléculas dependiendo tanto de la estructura de la molécula como del medio en que se halla ésta (Freifelder, 1991), la longitud de onda que se utiliza es de 260 nm, los contaminantes también se pueden identificar por espectroscopia ultravioleta desde los 200 nm a 300 nm. Un ratio de absorbancia a 260 nm en 280 nm de aproximadamente 1.8 indica que las muestras están libres de contaminación proteica, la cual se absorbe fuertemente a 280 nm. Existen diferentes tipos de espectroscopia de absorción tales como rayos gamma, rayos X, luz visible, luz polarizada,

infrarrojo y ultravioleta, siendo la última la más común. Los inconvenientes de esta técnica son que debido a la existencia de algunas impurezas, las mediciones de ADN pueden tener niveles de imprecisión de más de 10 veces sobrestimadas en algunos casos (Yu, *et al.*, 2005).

La espectroscopia de fluorescencia usando varios ADN con tintes intercalantes es la técnica más extensamente aceptada por su precisión. Sin embargo, el análisis a llevarse a cabo con esta técnica requiere volúmenes altos, por ejemplo 2 ml, lo cual es impráctico debido a los tintes costosos y si se cuenta con poca cantidad de ADN, también se puede llevar a cabo con pequeños volúmenes de ADN usando otros instrumentos tales como microplacas lectoras de fluorescencia, microplacas fluorómetras, transluminador de microplacas-CCD, pero los instrumentos no pueden estar disponibles en muchos laboratorios (Wang *et al.*, 2006; Rengarajan, 2002). La cuantificación por electroforesis en geles, comúnmente de agarosa, se basa en tener una cantidad conocida de ADN estándar separarla por electroforesis y compararla con las muestras, ésta puede proveer datos más precisos, sin embargo los procedimientos son más complicados y los datos frecuentemente aún no son suficientemente precisos (Wang *et al.*, 2006).

Las necesidades de los laboratorios de genética forense son diferentes a las de cualquier laboratorio de investigación debido a que el ADN extraído del indicio con el que se trabaja puede estar contaminado con ADN de cualquier microorganismo, por lo cual se usa la PCR cuantitativa (qPCR) en la que se utilizan instrumentos de PCR en tiempo real para medir fluorescencia. El ADN se tiñe con agentes intercalantes que emiten fluorescencia a 520 nm bajo excitación a 490 nm y cuando la PCR en tiempo real se realiza en tubos de PCR, equivale a las celdas usadas con un espectrofotómetro de fluorescencia (Wang *et al.*, 2006).

Métodos para el análisis de polimorfismos genéticos de interés forense

Análisis de VNTRs mediante RFLP

El método de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o *RFLP* (del inglés restriction fragment length polymorphism), se basa en la utilización de enzimas de restricción o restrictasas que cortan el ADN de forma muy específica en determinadas secuencias que han reconocido previamente. Las posibles diferencias en la secuencia del ADN

entre dos individuos, hacen que, para cada marcador el tamaño de los fragmentos generados de ADN puedan ser distintos (Farfán, 2006; Jacewicz-Miscicka, 2006; Laperche, *et al.*, 1991).

Los fragmentos de ADN resultantes deben separarse mediante un método de fraccionamiento adecuado, los métodos de separación se basan en diferentes características tales como tamaño, carga, entre otras, una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis (Maldonado-Jorrín, 2007). La velocidad de migración o movilidad a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son la intensidad de dicho campo, la carga neta, tamaño y forma de las moléculas; así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo. La electroforesis es una herramienta analítica simple, rápida y muy sensible. Los fragmentos de ADN, con carga negativa, migran hacia el polo positivo y lo hacen a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño de forma que los fragmentos más pequeños quedan en posiciones adelantadas en el gel que los fragmentos más grandes (Maldonado-Jorrín, 2007; Martínez *et al.*, 2003).

Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación como lo son la electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional. El soporte mas utilizado por su alta resolución y separación para los ácidos nucleicos es la poliacrilamida *PAGE* (polyacrilamide gel electrophoresis) (Túnez, 2002).

Los geles de poliacrilamida poseen una serie de ventajas como químicamente inertes, estables en un alto rango de pH, temperatura, fuerza iónica y fácil de generar mediante polimerización de acrilamida. Tal polimerización se inicia por un sistema redox de catálisis, el TEMED cataliza la formación de iones que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de persulfato de amonio, y que actúa como iniciador (Figura 4) (Maldonado-Jorrín, 2007; Wehr *et al.*, 2000). La electroforesis del ADN en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones no desnaturizantes o nativas (ND-PAGE) o desnaturizantes (SDS-PAGE). Las diferencias entre uno y otro tipo radican en los componentes de los geles, así como el tratamiento de las muestras que permiten abrir la doble cadena del ADN (Martinez et al, 2003; Maldonado-Jorrín, 2007).

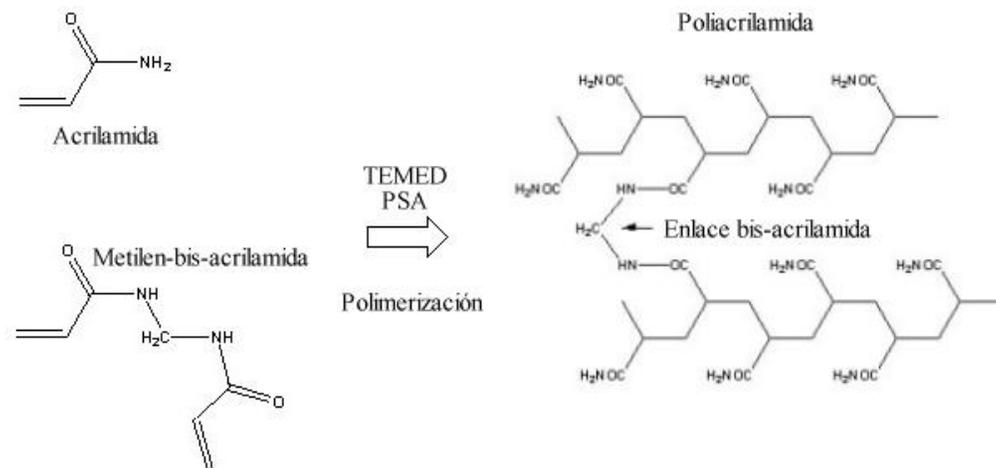


Figura 4. Reacción de polimerización de la acrilamida. Modificado de Maldonado-Jorrín, 2007.

Una vez, separados los fragmentos de restricción, éstos se transfieren desde el gel a membranas de nylon o nitrocelulosa, método *southern-blotting*, y se fijan a ésta. Posteriormente se realiza una detección específica para cada marcador mediante hibridación con sondas, que consisten en fragmentos de ADN previamente marcados con material radioactivo o quimioluminiscente que se unen de forma complementaria a un fragmento de ADN de la muestra, si la sonda se une a una región se le denomina sonda mono-locus o *SLP*, mientras que si se une a varias regiones se le conoce como sonda multi-locus o *MLP*. Estas sondas detectan entre 15 y 20 fragmentos variables de ADN en el individuo, con valores mayores de 3.5 Kb. En los casos con *VNTRs* con alelos no mayores de 1Kb, utilizando PCR, que se explicará en el siguiente apartado. Esto revelará la posición de una banda correspondiente a un alelo determinado, si el individuo es homocigoto, o de dos bandas correspondientes a dos alelos distintos, si el individuo es heterocigoto para ese locus. La posición dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN y el conjunto de todos los marcadores analizados permitirá establecer el perfil genético de un individuo (Farfán, 2006; Lorente *et al.*, 1994; Pineda, 1999; Helminen *et al.*, 1992; Jacewicz-Miscicka, 2006; Laperche, *et al.*, 1991).

Los polimorfismos *VNTRs* presentan una alta heterocigosidad, la tasa de mutación que presentan estos marcadores es variable y es despreciable en algunos de ellos y demasiado altas para otros (Tabla 2) (Vallejo, 2007; Pastore *et al.*, 1996). Este método presenta varias limitaciones que no lo hacen apropiado, a parte de la complejidad y laboriosidad de la técnica,

el principal inconveniente reside en que requiere entre 100 y 200 ng de ADN y además que éste no se encuentre degradado (Farfán, 2006).

Tabla 2. Principales VNTRs utilizados. Tomado de Vallejo, 2006.

Zona	Sonda	Heterocigosidad %	Tasa de mutación %
D1S7	MS1	94.6	5.2
D7S21	MS31	92.6	0.7
D12S11	MS43A	90	No observada
D5S43	MS8	77.5	No observada
D16S309	MS205	94.3	0.4
D7S22	G3	91.7	0.3
D2S44	YNH24	91	Menos de 0.2
Probabilidad de exclusión a priori acumulada (CE) mayor de 99.99%			

Análisis de STRs mediante PCR

Muchos de los vestigios biológicos de interés forense presentan cantidades muy pequeñas de ADN o un ADN muy deteriorado, por lo que no se pueden analizar mediante análisis de *RFLPs*. Para estos casos se usa la técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa o *PCR* (polimerase chain reaction). La PCR permite la obtención *in vitro* de millones de copias de un fragmento de ADN específico mediante una reacción enzimática cíclica (Farfán, 2006).

Los componentes básicos en una mezcla de reacción de PCR son: el *ADN molde* extraído a partir de la muestra, la cual requiere métodos que prevengan la degradación y eliminación de algunos inhibidores los cuales puedan ser problemáticos en algunas muestras (Al-soud *et al.*, 2000). Un par de *oligonucleótidos* o *primers* sintéticos de 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos primers actúan como cebadores para la síntesis de ADN la cual esta habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*, tal enzima se obtiene a partir de una bacteria termófila denominada *Thermus aquaticus*, capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85°C). A esta temperatura puede adicionar más de 60 nucleótidos por segundo en regiones con uniones C-G. El amortiguador de amplificación que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. el MgCl₂ es el componente que mas influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la *Taq* polimerasa. Los nucleótidos o *dNTP's*

son los que sirven de sustrato para complementar las nuevas cadenas de ADN, estos suelen usarse en una concentración de 200 μM para cada uno de ellos. Un proceso estándar de PCR implica la repetición de un número determinado de ciclos, cada uno de los cuales consta de tres pasos:

Desnaturalización: Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos.

Hibridación: Esta fase se denomina también fase de *annealing* o de alineación. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.

Extensión: Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb (Entrala, 2000; Dieffenbach-Dueksler, 2003; Innis *et al.*, 1990; While, 1993).

Estos tres pasos se repiten cíclicamente entre 25 y 35 veces en donde en cada ciclo se produce un incremento exponencial en el número de copias de forma que el resultado son millones de copias del segmento de ADN interesado. La PCR se lleva a cabo en un *termociclador* aparato que permite el calentamiento y enfriamiento de las muestras (Farfán, 2006; Innis *et al.*, 1990; While, 1993).

Este método se usa principalmente para el análisis de *STRs*, aunque también permite el análisis de *VNTRs* cortos (Kondopoulou *et al.*, 2001). El método convencional se basa en la determinación del tamaño en pares de bases de los fragmentos de ADN generados en la PCR, este tamaño está definido por el número de repeticiones presentes en cada alelo. La separación de los fragmentos se da mediante una electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio, azul de Coomassie o nitrato de plata, además de esto se requieren patrones alélicos de la población para cada marcador que sirvan de referencia para la asignación de los alelos presentes en la muestra problema, dispuestos por las casas comerciales en forma de kits para obtener el

máximo rendimiento de la mínima cantidad de ADN (Tabla 3). Las dos principales compañías mundiales implicadas en lo anterior son la Applied Biosystems y Promega Corporation (Farfán, 2006; Vallejo, 2006; Pineda, 1999; Lorente *et al.*, 1994).

Al inicio el estudio de los marcadores *STRs* requería de un análisis individual para cada marcador, mediante reacciones simples de PCR, sin embargo actualmente en los laboratorios de genética forense se pueden amplificar de forma simultánea hasta 15 loci en una misma reacción de amplificación denominada *PCR multiplex*, gracias al marcaje de los primers con fluorocromos que emiten señal a una longitud de onda determinada, así los productos amplificados, ya marcados y bajo condiciones desnaturalizantes, se separan de acuerdo a su tamaño con una gran resolución y se detectan con un sistema de láser incorporado a sistemas semiautomáticos llamados secuenciadores de electroforesis capilar. La posterior asignación de los alelos se realiza mediante un análisis automatizado con la utilización de programas informáticos que transforman las señales detectadas y separadas en función de su movilidad y se comparan automáticamente con un estándar interno marcado con fluorocromo diferente a los utilizados en los fragmentos amplificados. De esta forma se puede obtener un buen resultado a partir de un vestigio que contenga tan solo 100 células, mientras que para el análisis de *RFLPs* era necesario disponer de unas 20,000 células (Farfán, 2006; Vallejo, 2006; Kondopoulou *et al.*, 2001; Vallone *et al.*, 2008; Sirchia *et al.*, 1996).

La principal ventaja de la aplicación de la PCR al laboratorio forense reside en el espectacular incremento en la sensibilidad de la técnica de individualización por ADN. No obstante, ello conlleva el inconveniente de un elevado riesgo de contaminación por cualquier resto de ADN exógeno ya que también es susceptible de amplificación. Un inconveniente durante la amplificación por PCR de marcadores *STRs* por el método convencional es que pueden originarse una serie de artefactos que pueden interferir con una clara interpretación de los resultados y cuya consideración es necesaria para garantizar un correcto genotipado. Entre los más comunes cabe citar las bandas *stutter*, que son fragmentos con una (o varias) unidades de repetición menos que el alelo verdadero y generados por un fenómeno de tartamudeo de la polimerasa durante la amplificación (Farfán, 2006; Vallejo, 2006; Innis *et al.*, 1990; Entrala, 2000).

Actualmente se han identificado miles de *STRs*, entre los distintos tipos, los más comunes con fines forenses son aquellos cuyas repeticiones constan de cuatro nucleótidos, llamados *STRs*

tetraméricos autonómicos. Estos presentan la ventaja, frente a aquellos con unidades de repetición diferentes, de una mejor resolución entre alelos de tamaño próximo en individuos heterocigotos, así como una reducción en la formación de bandas *stutter* en la PCR (Farfán, 2006).

También existen *STRs* del cromosoma Y, situados principalmente en la porción heterocromática del brazo largo del cromosoma (Tabla 4). Estos presentan una diferencia importante respecto a los *STRs* del resto de los cromosomas, ya que su herencia es exclusivamente paterna y por tanto la información genética se hereda como haplotipo, es decir, los genotipos para cada uno de los marcadores se transmiten en bloque y no de forma independiente. En genética forense resulta de especial utilidad en los casos de agresión sexual, en donde el uso de marcadores específicos del cromosoma Y aumenta las posibilidades de detectar pequeñas cantidades de ADN masculino presentes en un fondo de abundante ADN femenino. La limitación de este tipo de análisis reside en que, dado que el cromosoma Y no está sujeto a recombinación, es menos variable entre individuos, por lo que es necesario el análisis de muchos marcadores para obtener un alto poder de discriminación (Farfán, 2006; Vallejo, 2006).

Tabla 3. Características de *STRs* incluidos en kits de amplificación desarrollados por Applied Biosystem: Profiler Plus, Cofiler e Identifier y Promega Corporation: Power Plex 16. Tomado de Vallejo, 2006.

Locus	Localización cromosómica	Kit amplificación	CE*	Tasa de mutación % materna-paterna
D3S1358	3p	Profiler Plus, Cofiler, Identifier, Power Plex 16	0.5892	0.03-0.15
vWA	12p12-pter	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.6405	0.05-0.32
FGA	4q28	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.7253	0.05-0.29
D8S1179	8	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.6382	0.03-0.20
D21S11	21	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.6939	0.11-0.15
D18S51	18q21.3	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.7421	0.06-0.20
D5S818	5q23.3-32	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.4593	0.02-0.14
D13S317	13q22-31	Profiler Plus, Identifier, Power Plex 16	0.5840	0.05-0.15
D7S820	7q11.21-22	Profiler Plus, Cofiler, Identifier, Power Plex 16	0.6128	0.02-0.13
D16S539	16q24-qter	Cofiler, Identifier, Power Plex 16	0.5442	0.02-0.11
TH01	11p15.5	Cofiler, Identifier, Power Plex 16	0.5882	0.01-0.01
TPOX	2p23-2pter	Cofiler, Identifier, Power Plex 16	0.3740	0.01-0.02
CSF1PO	5q33.3-34	Cofiler, Identifier, Power Plex 16	0.4487	0.02-0.14
Penta E	15q	Power Plex 16	0.7719	0.02-0.14
Penta D	21q	Power Plex 16	0.6826	-
D2S1338	2q35-37.1	Identifier	0.7447	0-0.02
D19S433	19q12-13.1	Identifier	0.6224	-
Amelogenina	X:p22.1-22.3 / P:11.2	Profiler Plus, Cofiler, Identifier, Power Plex 16	No aplicable	No aplicable
Probabilidad de exclusión a priori (CE total) = 0.999999956 *Valores obtenidos de la base de datos del INTCF de Madrid				

Tabla 4. Características de *STRs* del cromosoma Y. Tomado de Vallejo, 2006.

Locus	Localizacion cromosómica	Secuencia repeat 5'-3'	Diversidad génica %
DYS391	Yq	TCTA	56.10
DYS389I/II	Yq	(TCTG)(TCTA) Complex	65.54
DYS439	Yq	GATA	65.54
DYS393	Yq	AGAT	46.25
DYS390	Yq	(TCTG)(TCTA) Complex	60.64
DYS385a/b	Yq	GAAA	83.98
DYS438	Yq	TTTTC	58.86
DYS437	Yq	(TCTG)(TCTA) Complex	57.43
DYS19	Yq	TAGA Complex	56.26
DYS392	Yq	TAT	56.46
Diversidad del haplotipo observada >0.9981 (± 0.0021) Valores obtenidos de la base de datos del INTCF de Madrid			

Análisis de otros marcadores de ADN

A parte de los *STRs* autosómicos, los más usados para la individualización, existen otros marcadores genéticos de especial relevancia, algunos de los cuales presentan determinadas peculiaridades que los hacen idóneos para aplicaciones concretas.

ADN mitocondrial

Dentro de las mitocondrias se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt), se trata de una molécula circular de 16,569 pb en la que se localizan 37 genes implicados principalmente en los procesos de fosforilación oxidativa y que además posee una región no codificante denominada región control o *D-loop*. Esta región presenta una gran variación entre individuos y, por lo tanto, es útil para la identificación (Farfán, 2006).

Una célula posee numerosas mitocondrias, las cuales a su vez contienen numerosas moléculas de ADN, por lo que en cada célula existen entre 1,000 y 10,000 copias de ADNmt, este hecho unido a que la molécula es circular, hacen que el ADNmt sea de gran utilidad para muestras antiguas, degradadas o mínimas, así como en los tejidos con muy bajo o nulo contenido de ADN nuclear, como los huesos, dientes y pelos. El ADNmt es de herencia exclusivamente materna, así que no es único para cada individuo, sino que se comparte la misma secuencia con los individuos relacionados con él por vía materna. Dentro de la región control de ADNmt existen dos regiones hipervariables principales, HV1 y HV2, que comprenden en total 610 pb y concentran la mayor parte de la variación entre individuos. Estas dos regiones se analizan por

PCR y secuenciación, que consiste en la determinación de la secuencia de los pares de bases a lo largo de ambos segmentos. Los resultados obtenidos se reflejan como las diferencias encontradas respecto a la secuencia de Anderson, que es la primera secuencia de ADNmt encontrado. Algunas veces puede ocurrir una diferencia puntual entre las secuencias de un mismo individuo, fenómeno que se le conoce como heteroplasmia, la cual refuerza la probabilidad de coincidencia (Farfán, 2006; Moraga *et al.*, 2001).

Análisis de polimorfismos *SNPs*

Se le denomina polimorfismo de un solo nucleótido o *SNP* (del inglés single nucleotide polymorphism) a la variación entre individuos en una localización puntual del genoma, constituyen pequeños cambios de nucleótidos simples en el DNA, (Farfán, 2006). Los *SNPs* son las variaciones más comunes conocidas en la secuencia del genoma humano, además de ser las más polimórficas. Se estima que como promedio en el genoma humano existe un *SNP* cada 1200 pares de bases (Meyerson, 2003). Así, los *SNPs* tienen un excelente potencial como marcadores en estudios genéticos, en especial en genética forense.

El especial interés en genética forense se debe a que estos marcadores no presentan el fenómeno de bandas *stutter*, por lo que permiten discriminar mas fácilmente si una muestra es de origen único o es de una mezcla, presentan un mayor potencial para el desarrollo de sistemas multiplex, se ha demostrado que pequeños arreglos de aproximadamente 50 loci son comparables con múltiples *STRs*. El proceso de la muestra y el análisis de los datos son muy susceptibles a una alta automatización, además de su aplicación con muestras muy pequeñas y degradadas, así como productos de PCR con menos de 100 pb (Petkovski *et al.*, 2003).

Los *SNPs* son marcadores bialélicos, es decir, sólo existen dos alelos posibles para cada locus, determinados por la presencia de una base u otra en esa posición. Los *SNPs* autosómicos son los más frecuentemente encontrados en el genoma humano, con una baja tasa de mutación, además pueden encontrarse en regiones codificantes del ADN. Tienen una herencia altamente estable a diferencia de los polimorfismos de secuencias repetitivas, los cuales son perjudiciales en el análisis de herencia y una transmisión sexual inespecífica en el ADNmt o en el cromosoma Y. Finalmente, la detección y análisis de *SNPs* son relativamente fáciles de llevar a cabo, además de no requerir comparaciones con patrones alélicos (Petkovski *et al.*, 2003; Farfán, 2006).

En los últimos años y aún actualmente, se están desarrollando nuevas tecnologías para la miniaturización y automatización de este tipo de análisis basadas en ensayos con *microchips* que permiten el análisis simultáneo de miles de *SNPs*, por ejemplo como en el análisis de estructuras poblacionales donde se llegan a analizar cerca de 250,000 *SNPs* (Salmela *et al.*, 2008; Yamaguchi *et al.*, 2008).

Valoración de la prueba de paternidad

Una vez concluido el estudio genético a las personas interesadas, se comparan los perfiles genéticos de la madre y el hijo con el supuesto padre, basándose en la transmisión mendeliana simple de los caracteres genéticos, en donde tras la valoración se pueden establecer dos tipos de conclusiones.

Exclusión de paternidad

Cuando se comprueba en el hijo la presencia de un alelo que no posee al presunto padre ni la madre, para pruebas de identificación solo se compara el perfil genético del indicio con el del sospechoso. Existen dos reglas fundamentales que determinan dos tipos de exclusiones.

La primera regla de Landsteiner o exclusión directa establece que todo carácter presente en el hijo que no posea la madre, debe forzosamente proceder de su padre biológico, si el supuesto padre no lo posee, se produce la exclusión de primer orden. La segunda regla de Landsteiner o exclusión indirecta el hijo y el padre son homocigotos para un alelo distinto en un mismo locus. Si esto sucede se produce la exclusión de segundo orden. En este caso se debe tener en cuenta la posibilidad de que existan alelos silentes, mutaciones o alelos presentes pero no identificados en la población (Vallejo, 2006; Narkuti *et al.*, 2008; Narkuti *et al.*, 2007).

Si en la prueba se obtiene una única exclusión, para un solo marcador genético, por la primera regla de Landsteiner o dos por la segunda regla, se debe de calcular la probabilidad de paternidad, sin tener en cuenta los marcadores que han producido la exclusión. En el supuesto de que el número de exclusiones sea mayor que el indicado anteriormente, la exclusión se considera como probada (Vallejo, 2006; Valentin, 1980).

No exclusión de paternidad

Cuando se comprueba que en el hijo uno de los alelos procede de su madre y el otro puede proceder del supuesto padre, para cada uno de los marcadores analizados. Si no observan inconsistencias genéticas se habla de resultados analíticos con compatibilidad genética entre el supuesto padre y el hijo y será obligatoria la evaluación estadística de la paternidad (Vallejo, 2006; Valentin, 1980).

Valoración estadística

Una vez que se concluye que el presunto padre es compatible genéticamente con el hijo, entonces debe plantearse si el presunto padre es el único hombre compatible genéticamente con la paternidad de ese hijo o bien si en la población de referencia, existen muchos o pocos individuos que también se pueden denominar como compatibles genéticamente para la paternidad planteada (Vallejo, 2006).

Para tal planteamiento se realiza el cálculo de la paternidad mediante la aplicación del teorema de Bayes, el cual se basa en las probabilidades finales de un suceso a partir de las probabilidades iniciales, dada cierta información o informaciones adicionales obtenidas. En la prueba de la paternidad se plantean dos hipótesis mutuamente excluyentes, es decir que la probabilidad de que las dos hipótesis se den a la vez es nula. La hipótesis nula afirma que el supuesto padre es el padre biológico y la hipótesis alternativa afirma que el padre biológico es cualquier otro hombre de la población. El índice de paternidad es el cociente de estas probabilidades donde el numerador asume la hipótesis nula y el denominador asume la hipótesis alternativa. Así, el índice de paternidad es un índice de verosimilitud de dos probabilidades condicionales sobre dos hipótesis excluyentes (Rocheta *et al.*, 2007; Piazza-Liò, 2005; Hummel-Gerchow, 1981; Wenk *et al.*, 2005). El índice de paternidad indica cuantas veces es mayor la probabilidad del presunto padre de ser el padre biológico con respecto a un hombre tomado al azar y se representa como:

$$IP = \frac{(X)(Y^*) + (X^*)(Y)}{(X)(Z^*) + (X^*)(Z)}$$

Donde:

X = es la probabilidad de que la madre haya heredado el primer alelo del hijo.

X* = es la probabilidad de que la madre haya heredado el segundo alelo del hijo.

Y = es la probabilidad de que el supuesto padre haya heredado el primer alelo del hijo.

Y* = es la probabilidad de que el supuesto padre haya heredado el segundo alelo del hijo.

Z = es la probabilidad de que algún otro hombre haya transmitido el primer alelo del hijo.

Z* = es la probabilidad de que algún otro hombre haya transmitido el segundo alelo del hijo.

- La probabilidad de heredar un alelo es del 50% ($p=0.5$) para cualquier caso ya que según Mendel forzosamente un alelo debe provenir de la madre y el otro del padre biológico.
- La probabilidad de Z y Z* esta dada por la frecuencia de esos alelos en la población (Apéndice 4).

El IP se calcula para cada locus analizado multiplicándose entre sí para obtener el índice combinado de paternidad ICP. El ICP es el producto que evalúa la información genética obtenida en todos los loci analizados, la cual indica si la evidencia ajusta mejor con la hipótesis de que el hombre estudiado es el padre o con la hipótesis de que alguien más es el padre. Expresa el “ajuste” relativo de los datos genéticos a las hipótesis de paternidad o no paternidad (Piazza-Liò, 2005).

La probabilidad de la paternidad se calcula:

$$PP = \frac{ICP}{ICP + 1} \times 100$$

La cual indica la probabilidad que tiene ese individuo de ser el padre biológico, comparado con un hombre al azar de la población. Para hacer estos resultados más inteligibles, tanto la probabilidad de paternidad como el índice de paternidad se comparan con los criterios internacionalmente aceptados de Hummel (Tabla 5) (Vallejo, 2006; Piazza-Liò, 2005; Hummel-Gerchow, 1981; Pena-Chakraborty, 1994).

Tabla 5. Criterios de Hummel. Tomado de Vallejo, 2006.

Probabilidad de paternidad	Índice de paternidad	Rango de paternidad
99.73% o más	>399:1	Prácticamente probada
Más de 99%	>95:1	Extremadamente probable
Más de 95%	>19:1	Muy probable
Más de 90%	>9:1	Probable

4. OBJETIVOS

General:

- Estandarizar un protocolo para el análisis de 11 regiones STRs en el genoma humano a partir de sangre periférica en la resolución de casos de identificación humana con fines de exclusión de paternidad.

Particulares:

- Extraer ADN a partir de sangre periférica por el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y por el método de papel FTA Whatman.
- Determinar la concentración óptima de ADN y cantidad de discos de papel FTA para la amplificación de los STRs CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, F13A01, F13B, FESFPS, LPL, TH01, TPOX y vWA.
- Estandarizar las condiciones de corrimiento electroforético y concentración del gel de poliacrilamida para la separación de los productos de PCR.
- Determinar la mejor tinción de los geles de poliacrilamida con tres variantes de nitrato de plata y con bromuro de etidio.
- Utilizar el protocolo estandarizado para la elaboración del perfil genético con los 11 STRs de 2 tríos (constituídos por el supuesto padre, la madre y el hijo) para adjudicar la paternidad.

5. HIPÓTESIS

Si se estandarizan de forma adecuada los protocolos para la detección de 11 regiones STRs del genoma humano entonces esta técnica permitirá resolver casos de identificación humana con énfasis en la exclusión de paternidad mediante la técnica de PCR y electroforesis en geles de acrilamida reproducibles en laboratorios de investigación y permitirá realizar posteriores estudios tales como detectar en la población mexicana la frecuencia en la que se encuentran algunos marcadores que solo se tienen registrados para poblaciones europeas o de hispanoamérica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados, el trabajo se dividió en dos etapas, la primera de ellas fue la estandarización del protocolo para 11 regiones STRs dispuestos en los kits comerciales GenePrint® STR Systems (silver stain detection) de Promega Corporation, la cual incluyó, el aislamiento, purificación y cuantificación del ADN de diferentes personas para lograr la mejor amplificación y separación electroforética de los productos amplificados de los 11 STRs. La segunda etapa consistió en la valoración del protocolo estandarizado elaborando el perfil genético de dos tríos para adjudicar la paternidad de sus hijos.

Estandarización del protocolo

Extracción de ADN

Se realizó utilizando los métodos de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y en papel FTA Whatman para dos personas.

Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: Se extrajeron 3 ml de sangre periférica de dos personas y se vertieron en tubos Falcon de 15 ml con heparina como anticoagulante, se adicionaron directamente 12 ml de agua bidestilada estéril y se mezcló suavemente, se centrifugaron los tubos a 5,000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el agua y se resuspendió el botón en 200 µl de amortiguador de lisis con pronasa (Tris 10 mM pH 8, EDTA 20 mM, SDS 0.5% y pronasa 25 mg/ml) se incubó a 37°C durante 1 hora, posteriormente se adicionaron 320 µl de acetato de sodio 375 mM y se incubó por 20 minutos a 37°C, se transfirió el contenido a tubos Eppendorf de 2 ml y se adicionaron 480 µl de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex durante 5 minutos., se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa se separó y se adicionó el mismo volumen de isopropanol enfriado previamente a -20°C, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 980 µl de alcohol etílico al 80%, nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras a 60°C por 5 minutos.

Tarjetas FTA: En condiciones estériles, se colocaron gotas de sangre en tarjetas de papel FTA Whatman hasta llenar los círculos y se permitió que se secaran, se realizaron 20 perforaciones de 1.2 mm de diámetro con un perforador Harris (micropuncher) y se colocaron los discos en un tubo Eppendorf de 1.5 ml Se adicionaron 800 µl de reactivo FTA® de lisis y se incubó a temperatura ambiente con agitación (500 rpm) por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 800 µl de agua bidestilada estéril, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos a 500 rpm, se eliminó el agua y se repitieron nuevamente los dos últimos pasos, se eliminó el agua y se secaron los discos de FTA a 60°C durante 30 minutos.

Cuantificación del ADN

Una vez seco el ADN extraído por el método de fenol-cloroformo se procedió a hidratarlo con 20 µl de agua bidestilada libre de nucleasas y agitación por 5 minutos a 60°C y una dilución 1:200, se cuantificó por espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 y 280 nm.

Amplificación de los STRs

Para determinar los 11 loci se realizó la técnica de PCR, para lo cual se utilizaron juegos de primers diseñados por Promega Corporation específicos para cada locus (Tabla 6). El volumen final para cada reacción fue de 25 y 12.5 µl Se utilizaron las siguientes concentraciones del ADN (extraído por el método de fenol-cloroformo): 231.5, 200, 139, 120, 69.5, 60, 34.75, 30, 15 y 7 ng diluidos en un volumen final de 2.5 µl de agua libre de nucleasas. También se realizó la amplificación de ADN contenido en 1 y dos discos de papel FTA. Las cantidades empleadas de los distintos reactivos en las mezclas de reacción utilizadas en el protocolo definitivo se encuentran en el apéndice 1. Los ciclos de amplificación para cada locus se llevaron a cabo de acuerdo a lo que recomienda el fabricante (Tabla 7).

Tabla 6. Información específica para cada locus del sistema monoplex® y multiplex (D16S539, D7S820 y D13S317). Tomado de Promega, 2008.

Locus STR	Localización cromosomal	Repetición de secuencia 5'→3'	Tamaño pb ¹	Alelos (# de repeticiones)	Otros alelos conocidos	DNA K562 ³ (control +)
1. CSF1PO	5q33.3.34	AGAT ²	295-327	7,8,9,10,11, 12,13,14,15	6	10, 9
2. D16S539	16q24.qter	AGAT ²	264-304	5,8,9,10,11, 12,13,14,15	No	12,11
3. D7S820	7q11.21.22	AGAT ²	215-247	6,7,8,9,10, 11,12,13,14	No	11, 9
4. D13S317	13q22.q31	AGAT ²	165-197	7,8,9,10,11, 12,13,14,15	No	8,8
5. F13A01	6p24.3.p25.1	AAAG ²	283-331	4,5,6,7,8,9,11, 12,13,14,15,16	3,2,10	5,4
6. F13B	1q31.q32.1	AAAT ²	169-189	6,7,8,9,10,11	12	10,10
7. FESFPS	15q25.qter	AAAT ²	222-250	7,8,9,10,11,12,13,14	No	12,10
8. LPL	8p22	AAAT ²	105-133	7,9,10,11,12,13,14	8	12,10
9. TH01	11p15.5	AATG ²	179-203	5,6,7,8,9,10,11	9.3	9.3, 9.3
10. TPOX	2p25.1.pter	AATG ²	224-252	6,7,8,9,10,11,12,13	No	9,8
11. vWA	12p12.pter	AGAT ²	139-167	13,14,15,16, 17,18,19,20	11,21	16,16
Poder de exclusión a-priori en la población Hispano-Americana mayor de 0.9986						

¹La longitud de cada alelo en la escala alélica se ha confirmado por análisis de secuencia.

²Las secuencias repetitivas representan todas las cuatro posibles permutaciones.

³Alelos esperados para cada STR.

Tabla 7. Protocolos de amplificación para cada locus. Tomado de Promega, 2008.

Protocolos de amplificación				
Locus STR	Incubación inicial	10 ciclos	20 ciclos	Extensión
FESFPS	96°C – 2 minutos	94°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	90°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	No
LPL, F13B, vWA, Multiplex (D16S539, D7S820, D13S317)	96°C - 2 minutos	94°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	90°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	60°C- 30 minutos
CSF1PO, F13A01, TPOX, TH01	96°C - 2 minutos	94°C- 1 minuto 64°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	90°C- 1 minuto 64°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	No

Separación electroforética

A los productos de las reacciones de PCR se les adicionaron 5 µl de la solución de carga (Apéndice 2) y se procedió a separar los fragmentos amplificados mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes con una dimensión de 16x16 cm x 0.75 y 0.5 mm para los locus individuales (monoplex) y 16x20 cm x 0.75 y 0.5 mm para el sistema multiplex en concentraciones de 4%, 6%, 8%, 10% y 12% utilizando TBE 0.5X como amortiguador de corrimiento (apéndice 3). Una vez calibrada la cantidad de ADN óptima para la amplificación se probó el volumen de producto amplificado que se adiciona al gel de 25, 12.5, 10, 8, 5 y 2.5 µl, en cada separación se utilizó un marcador molecular de 50 pb para determinar el tamaño molecular de cada locus por comparación y calibrar el tiempo y voltaje en una cámara de electroforesis vertical. Como control positivo se utilizó el DNA K562 provisto en cada kit de Promega.

Tinción

Una vez finalizada la electroforesis, para la visualización de los fragmentos, el gel se tiñó con bromuro de etidio y con nitrato de plata.

Tinción con Plata: Se probaron tres variantes para esta tinción, la primera variante fue con el kit silver stain detection de Promega, la segunda variante con la técnica descrita por Sambrook *et al.*, 1989 y una tercer variante modificada en el laboratorio de bioquímica del Instituto de investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Primer variante: consistió en sumergir el gel en 300 ml de las siguientes soluciones: 300 ml de ácido acético al 10% durante 20 minutos, tres lavados con agua desionizada por 2 minutos, solución de nitrato de plata 0.1% y 1.5ml/l de formaldehído al 37% por 30 minutos, un lavado con agua desionizada por 20 segundos, una solución reveladora (1.5ml/l de formaldehído al 37%, tiosulfato de sodio 10mg/ml, carbonato de sodio 30%) hasta que se detectaron las bandas, finalmente se incubó en ácido acético al 10% por 5 minutos y se realizó un lavado con agua desionizada.

Segunda variante: el gel se sumergió en una solución de etanol 10% y ácido acético 0.5% por 5 minutos, se incubó por 10 minutos en una solución de nitrato de plata al 0.1%, se lavó dos

veces con agua desionizada por 20 minutos, se eliminó el agua y se adicionaron 300 ml de una solución que contenía NaOH 1.5%, NaBH₄ 0.01%, 4ml/l de formaldehído al 37%, por último se fijó en una solución de carbonato de sodio 0.75%.

Tercer variante: el gel se fijó en una solución de TCA al 20% por una hora, se sumergió en una solución de etanol al 40% y ácido acético al 10% por 30 minutos dos veces, se lavó por duplicado con agua desionizada durante 20 minutos, se eliminó el agua y se incubó con glutaraldehído al 10% por 30 minutos, se lavó el gel tres veces con agua desionizada por 20 minutos, posteriormente se incubó durante 30 minutos con la solución de plata (nitrato de plata 0.8%, hidróxido de sodio 0.076% y 4 ml de hidróxido de amonio al 25% por cada 100 ml), se lavó tres veces con agua por cinco minutos, y se adicionó la solución de revelado (ácido cítrico 0.025% y 52 µl de formaldehído al 37% por cada 100 ml), una vez que se detectaron las bandas se adicionó la solución de etanol 40% y ácido acético 10%, por último el gel se lavó con agua desionizada.

Una vez teñidos los geles se colocaron en papel filtro y se secaron con ayuda de un secador de geles al vacío por 45 minutos a 60°C.

Bromuro de etidio: una vez que finalizó la electroforesis, los geles en condiciones no desnaturalizantes, se sumergieron en una solución de bromuro de etidio 0.67 µg/ml por 2 minutos y un posterior lavado con agua desionizada de 3 minutos antes de capturar la imagen en un analizador de geles acoplado a un transluminador de luz ultravioleta.

Pruebas de paternidad

Para la valoración de la prueba se tomaron muestras de sangre periférica de la madre, su hijo y el supuesto padre para dos tríos:

Primer pareja			Segunda pareja		
Donante	Edad	Sangre periférica	Donante	Edad	Sangre periférica
Madre	23 años	3 ml y FTA	Madre	44 años	FTA
Hijo	7 meses	500 µl y FTA	Hijo	25 años	FTA
Supuesto padre	25 años	3 ml y FTA	Supuesto padre	45 años	FTA

Extracción de ADN: La extracción del ADN se llevó a cabo en tarjetas de papel FTA y por el método de fenol-cloroformo para el primer trío, mientras que para el segundo trío solo se extrajo en tarjetas de papel FTA.

Amplificación: Una vez extraído el ADN se amplificaron las 11 regiones STRs para cada donador con 7 ng de ADN extraído por el método de fenol-cloroformo y 1 disco de papel FTA de 1.2 mm que de acuerdo a lo que describe la casa comercial contiene de 5 a 20 ng de ADN (Burgos *et al.*, 2007; Whatman, 2008), para el primer trío y solo en FTA para el segundo, en un volumen total para cada reacción de 12.5 µl siguiendo los ciclos de amplificación de la tabla 7 para obtener el perfil genético de cada donador con estas 11 regiones.

Separación electroforética: Las muestras amplificadas se separaron en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturizantes de 16x16 cm x 0.5 mm para los monoplexes y de 16x20 cm x 0.5mm para el sistema multiplex con TBE 0.5X como amortiguador de corrimiento a 300V y 40 mA de 90 a 130 minutos dependiendo de la región amplificada (Tabla 8) con un marcador molecular de 50 pb y patrones alélicos de cada región entre las muestras de los donantes, así como un control positivo y uno negativo.

Tinción: La tinción para la visualización de las bandas se llevó a cabo con un lavado de bromuro de etidio 0.67 µg/ml por 2 minutos y un lavado por 3 minutos con agua desionizada antes de colocar el gel en un analizador de geles acoplado a un transluminador de luz ultravioleta para capturar las imágenes.

7. RESULTADOS

Estandarización del protocolo

Se realizaron varios ensayos para determinar las condiciones generales necesarias para una buena amplificación y separación electroforética de los STRs, inicialmente se probaron las regiones LPL, F13B, vWA, FESFPS y multiplex ya que las regiones LPL, F13B y vWA son las más cortas, mientras FESFPS y el multiplex son de las más largas. Las muestras biológicas que se utilizaron fueron las siguientes:

Muestras	Edad	Sangre periférica	ADN extraído fenol-cloroformo (ng/μl)
A	24 años	3 ml y en FTA	1390
B	25 años	3 ml y en FTA	1200

Determinación de las condiciones óptimas del gel

La primera etapa consistió en la calibración de la concentración del gel usando una concentración elevada de ADN con geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes que van desde el 4 al 12% y se realizó la tinción con plata. La razón por la que se utilizó una concentración elevada de ADN fue por que durante las tinciones con nitrato de plata (silver stain detection y la descrita por Sambrook *et al.*) de los geles en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes se observaban resultados de baja resolución, en ciertos casos nulos, además de probar estas tinciones se trabajaron diferentes concentraciones y condiciones del gel, de los cuales los que generaron los mejores resultados fueron los geles no desnaturalizantes, que además de ser mas fáciles en su preparación, requieren de menos reactivos como lo es la urea, dado que se requerían aproximadamente 25 g para la preparación de cada gel. Otros factores importantes que se evitaron fueron la necesidad de desnaturalizar las muestras antes de separarlas y el mayor tiempo requerido para la electroforesis. Los resultados más representativos son los siguientes geles:

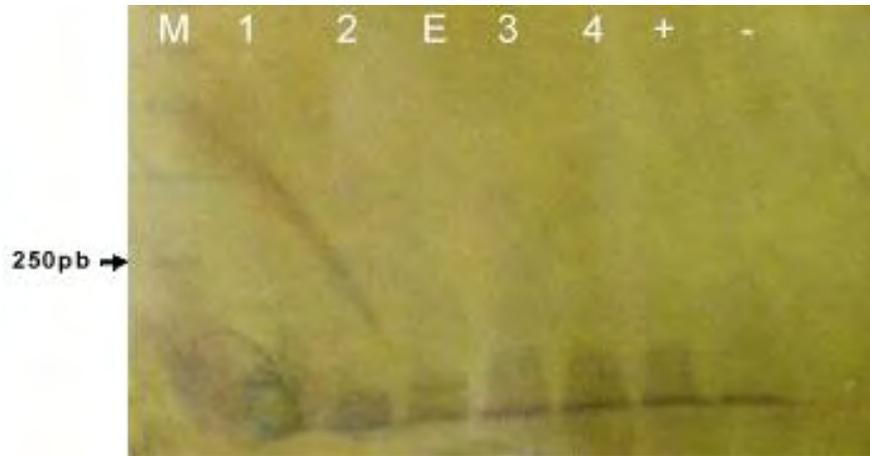


Figura 5. Locus vWA resuelto en un gel desnaturizante de 16 x 16 cm x 0.75 mm al 4% de poliacrilamida y teñido con nitrato de plata (primer variante). En el gel carril M se colocó un marcador de peso molecular de 50 pb, en el carril E se muestra el patrón alélico, los carriles 1 y 2 corresponden a la muestra A (231.5 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), los carriles 3 y 4 corresponden a la muestra B (200 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), el control positivo (+) y negativo (-).



Figura 6. Locus vWA resuelto en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes de 16 x 16 cm x 0.75 mm y teñido con nitrato de plata (primer variante). El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, el carril E corresponde al patrón alélico, los carriles 1 y 2 corresponden a la muestra A (231.5 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), los carriles 3 y 4 a la muestra B (200 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), el control positivo (+) y negativo (-).

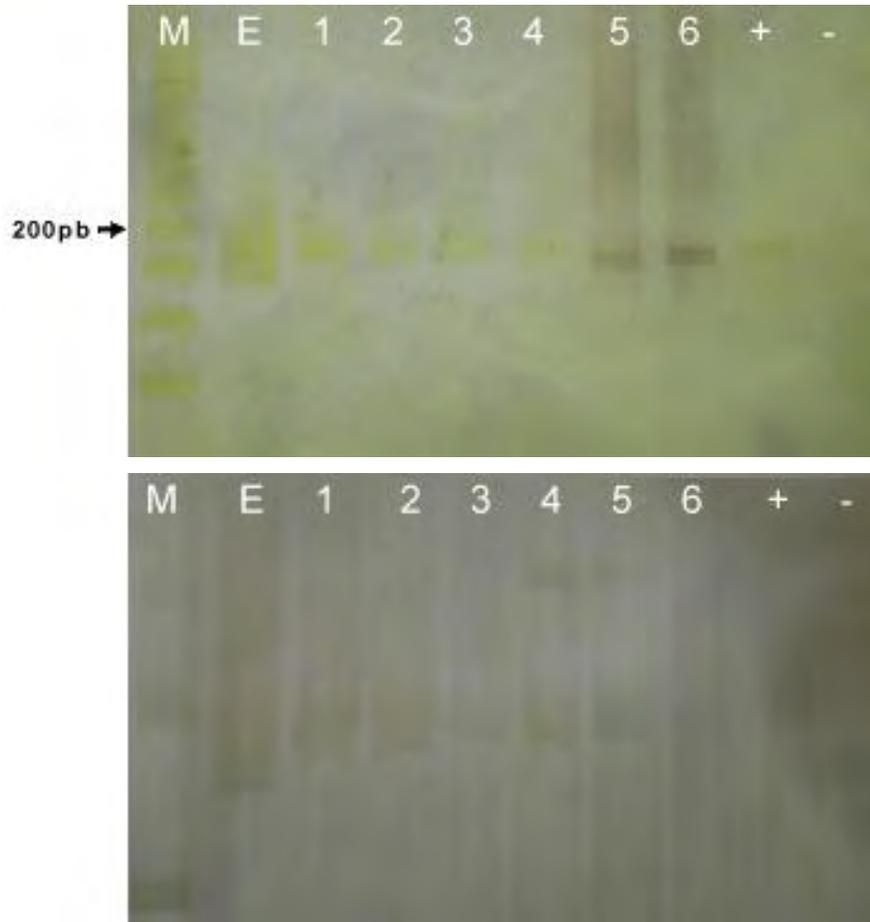


Figura 7. Locus F13B. Los productos de la amplificación se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (arriba) y no desnaturalizantes (abajo) de 16 x 16 cm x 0.75 mm y teñidos con nitrato de plata; primer variante (arriba) y segunda variante (abajo). El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, el carril E al patrón alélico, los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la muestra A (231.5 ng, 139 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la muestra B (200 ng, 120 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), el control positivo (+) y negativo (-).



Figura 8. Locus LPL. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturizantes de 16 x 16 cm x 0.75 mm y se tiñó con nitrato de plata (silver stain detection). El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, el carril E es el patrón alélico, los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la muestra A (231.5 ng, 139 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la muestra B (200 ng, 120 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), un control positivo (+) y negativo (-).

Posteriormente se empleó la tinción con bromuro de etidio para las regiones LPL y FESFPS, con el fin de probar si existía una mejor detección de bandas comparada con las tinciones empleadas anteriormente. Como resultado se obtuvo una mejor visualización de las bandas (Figura 9) y se encontró que las concentraciones óptimas del gel fueron de 8 y 10%.

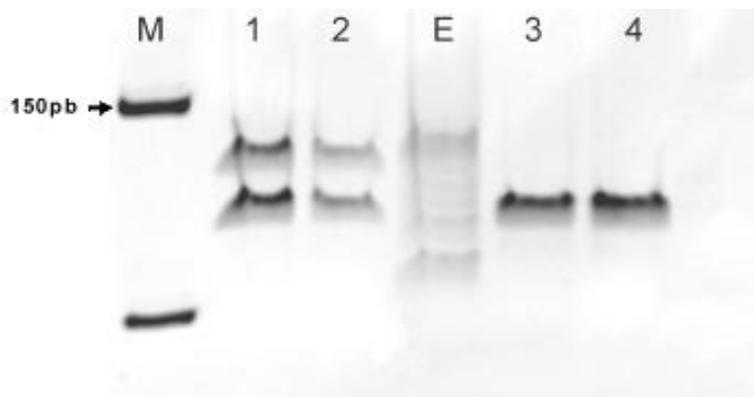


Figura 9. Locus LPL. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturizantes de 16 x 16 cm x 0.75 mm al 10% y se tiñó con bromuro de etidio. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, el carril E es el patrón alélico, los carriles 1 y 2 corresponden a la muestra A (231.5 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente), los carriles 3 y 4 corresponden a la muestra B (200 ng y 2 discos de papel FTA respectivamente).

Determinación de la concentración óptima de ADN en la amplificación.

La siguiente etapa consistió en determinar la concentración óptima de ADN para lograr una buena amplificación, así como determinar la cantidad de producto de PCR necesaria para una buena visualización de los productos de amplificación. Los amplicones se detectaron en forma de bandas en geles de poliacrilamida al 8 y 10% corridos en condiciones no desnaturalizantes, para lo que se requirió teñir con bromuro de etidio, debido a que no se logró detectar los resultados de forma adecuada con las diferentes modificaciones que se realizaron a la tinción de nitrato de plata (primera y segunda variante). Finalmente, se evaluó el tiempo y el voltaje óptimos durante la electroforesis para obtener la mejor definición de las bandas para cada locus (Figura 10 y 11).

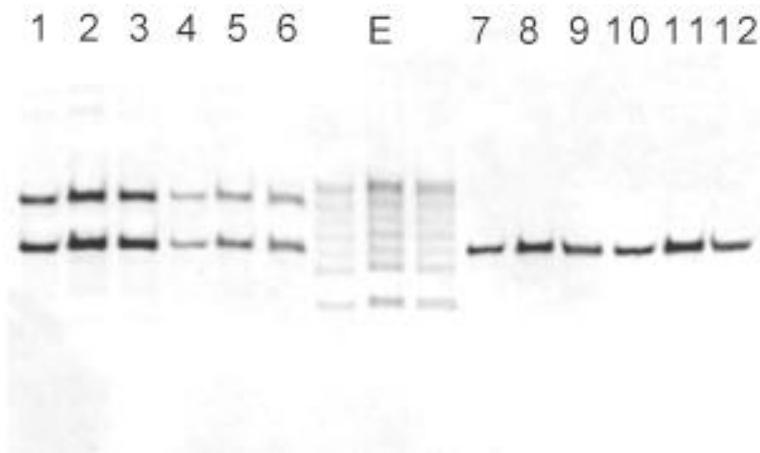


Figura 10. Locus LPL. Los amplicones se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 10% de 16 x 16 cm x 0.75 mm teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1 al 6 corresponden a la muestra A con la siguientes concentraciones en nanogramos de ADN: 231.5, 139, 69.5, 34.75, 2 discos de papel FTA y un disco de papel FTA respectivamente. E1, E2 y E3 corresponden a: 2.5, 7.5 y 5 μ l del patrón alélico. Los carriles 7 al 12 corresponden a diferentes concentraciones en nanogramos de ADN que se utilizaron para la amplificación de la muestra B: 200, 120, 60, 30, 2 discos de papel FTA y 1 disco de papel FTA respectivamente.

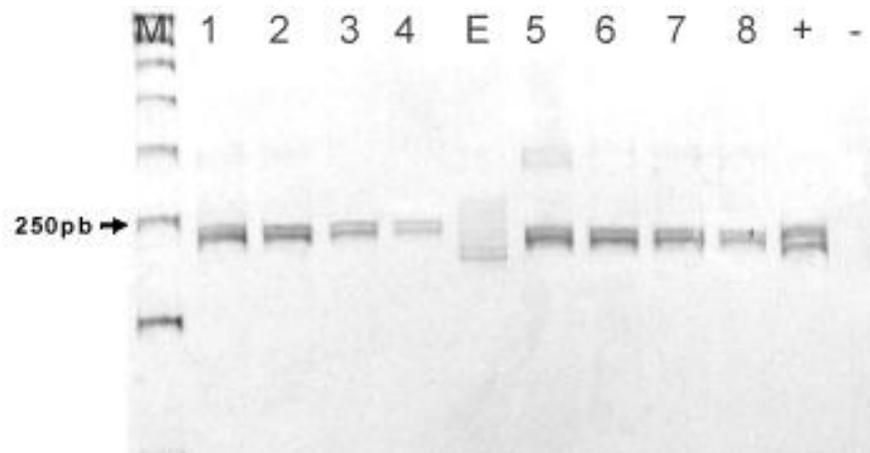


Figura 11. Locus FESFPS. Los amplicones se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 8% de 16 x 16 cm x 0.75 mm teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1 al 4 corresponden a la muestra A con la siguientes concentraciones en nanogramos de ADN: 34.75, 15, 7 y un disco de papel FTA respectivamente. E corresponden al patrón alélico, los carriles 5 al 8 corresponden a diferentes concentraciones en nanogramos de ADN que se utilizaron para la amplificación de la muestra B: 30, 15, 7 y un disco de papel FTA respectivamente, el control positivo (+) y el negativo (-).

Se utilizaron concentraciones del gel de poliacrilamida al 8 y 10%, debido a que generaron una buena separación en la amplificación de las regiones más cortas (LPL, vWA, F13B y TH01) y una moderada en las regiones más largas (CSF1PO, F13A01, FESFPS, TPOX y multiplex). Sin embargo, no se detectó diferencia en la separación de las bandas con estas dos concentraciones del gel por lo que se utilizó la concentración al 8% y un tiempo de electroforesis de 90 a 130 minutos (Tabla 8).

También se evaluó una tercera variante de la tinción con nitrato de plata que se modificó en el laboratorio de bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el resultado se muestra en la Figura 12, la cual se utilizó en un gel pequeño debido a que requería menos volumen de cada solución, el resultado fue el siguiente:

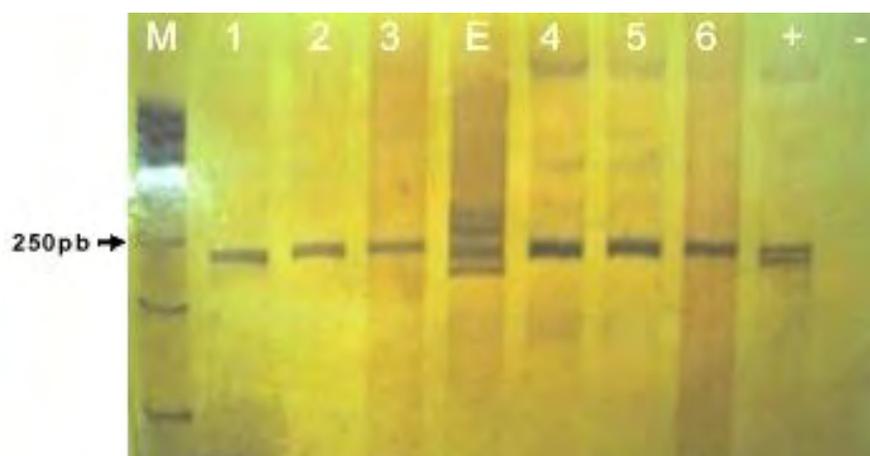


Figura 12. Locus FESFPS. Los productos de la amplificación se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12% de 8.3 x 7.3 cm x 0.75 mm corrido en condiciones no desnaturalizantes y teñido con modificaciones a la tinción de nitrato de plata del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, el carril E corresponde al patrón alélico, los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la muestra A (15 ng, 7 ng y un disco de papel FTA respectivamente), los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la muestra B (15 ng, 7 ng y un disco de papel FTA respectivamente), un control positivo (+) y negativo (-).

La concentración óptima de ADN para la amplificación fue de 7 ng y la cantidad de producto de PCR óptima que se adiciona al gel va desde 5 a 8 μ l de un volumen total por reacción de PCR de 12.5 μ l. La tabla 8 muestra el tiempo de electroforesis necesaria para cada locus, así como las condiciones para el corrimiento electroforético del gel.

Tabla 8. Condiciones utilizadas en el corrimiento electroforético de los geles de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturalizantes para cada locus a un voltaje de 300V y 40mA.

STRs	Dimensión del gel	Tiempo de corrimiento electroforético (minutos)
LPL	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	90
vWA	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	100
F13B	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	100
TH01	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	110
TPOX	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	120
FESFPS	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	120
CSF1PO	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	140
F13A01	16x16cm x 0.5 o 0.75mm	130
Multiplex	16x20cm x 0.5 o 0.75mm	130

Durante los ensayos se originaron algunos problemas, uno común fue la presencia de algunos inhibidores que hacían en algunos casos una amplificación pobre o nula, generalmente con las muestras embebidas en los discos de papel FTA, pero se solucionó este problema volviendo a preparar nuevos discos de papel FTA, sin embargo el principal problema que se presentó fue la contaminación de las muestras. La contaminación que se observó en todos los casos aparecía como el patrón alélico en los carriles donde se depositaron las muestras. La figura 13 muestra el caso de un gel en donde se presentó la contaminación.

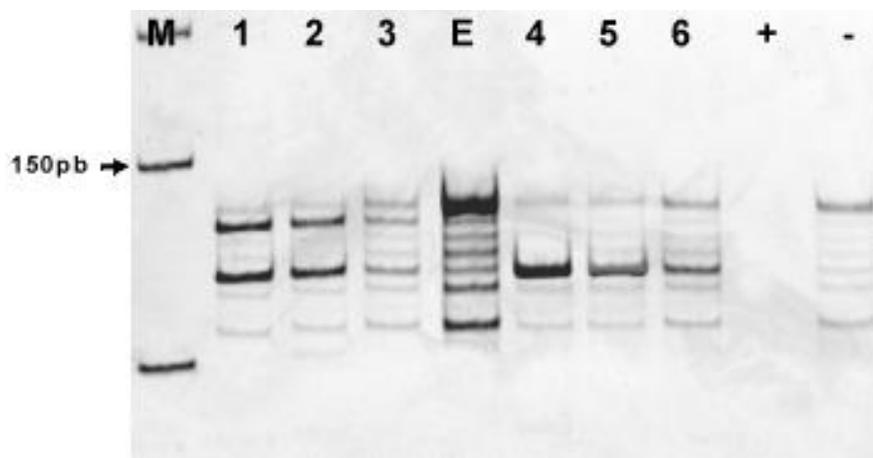


Figura 13. Locus LPL. Los amplicones se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 8% de 16 x 16 cm x 0.75 mm teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1 al 3 corresponden a la muestra A con las siguientes concentraciones en nanogramos de ADN: 69.5, 34.75 y un disco de papel FTA respectivamente. El carril E corresponde al patrón alélico, los carriles 4 al 6 corresponden a diferentes concentraciones en nanogramos de ADN que se utilizaron para la amplificación de la muestra B: 60, 30 y un disco de papel FTA respectivamente. Un control positivo (+) y negativo (-). Se puede observar que las muestras A y B tienen cierto grado de contaminación por el patrón alélico, siendo más evidente en los carriles con el disco de papel FTA (3 y 6), el control positivo no se amplificó, mientras el control negativo presenta la misma contaminación que las muestras.

Para eliminar esta contaminación se requirió de altas medidas de limpieza lavando todo el material y equipo de amplificación con hipoclorito de sodio al 5%, etanol al 70% y un posterior esterilizado con luz ultravioleta por 12 h.

Pruebas de paternidad

Para analizar las muestras de ADN que se obtuvieron del primer trío se utilizaron los métodos de extracción de ADN de fenol-cloroformo y el de tarjetas de papel FTA. Dado que los resultados obtenidos eran prácticamente iguales por ambos métodos, para el segundo trío solo se utilizó el de tarjetas de papel FTA (Tabla 9).

Tabla 9. Cantidad de ADN obtenido en la primera pareja.

Primer trío	
Donante	ADN extraído fenol-cloroformo (ng/μl)
Madre	2530
Hijo	120
Supuesto padre	1700

Para obtener el perfil genético de cada individuo de los dos tríos, se utilizaron los 11 STRs, se emplearon las condiciones previamente estandarizadas de cada uno de los protocolos. Los resultados se analizaron por comparación de la posición de la o las bandas que se detectaron en cada individuo con el patrón alélico para cada locus (Figura 14).

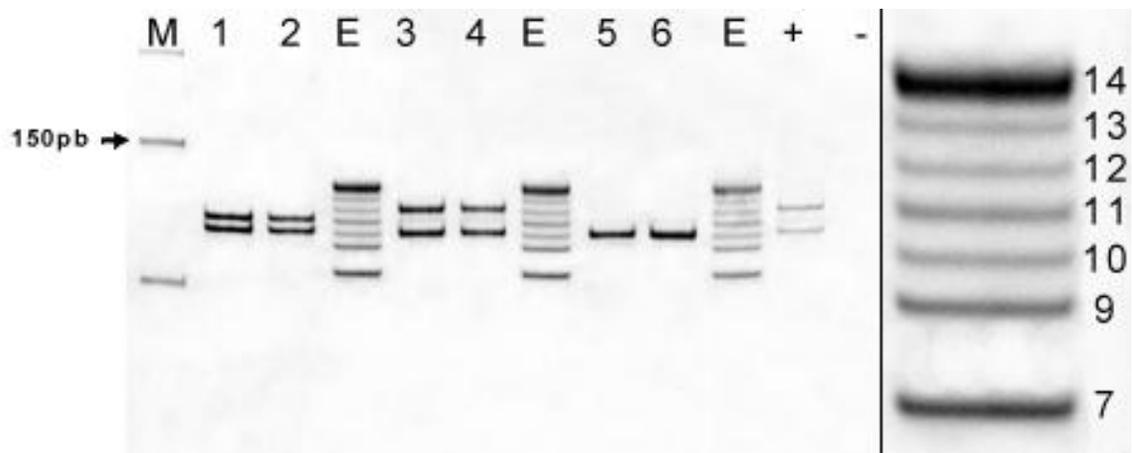


Figura 14. Locus LPL para el primer trío. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, El carril E corresponde al patrón alélico, los carriles 1 y 2 corresponden a la madre, los carriles 3 y 4 al hijo, los carriles 5 y 6 corresponden al supuesto padre (ADN en solución y disco de papel FTA)

respectivamente), el control positivo (+) y el negativo (-). A la derecha se muestra el patrón alélico con el número de repeticiones que corresponden a cada alelo.

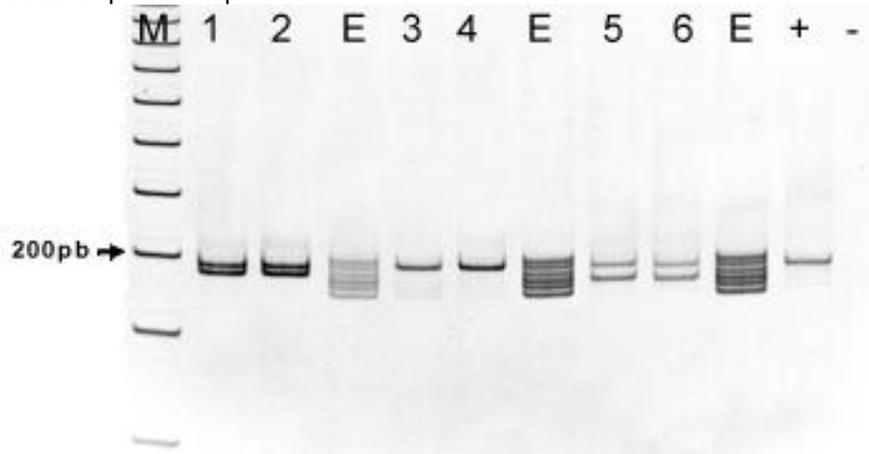


Figura 15. Locus F13B para el primer trío. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, El carril E corresponde al patrón alélico, los carriles 1 y 2 corresponden a la madre, los carriles 3 y 4 al hijo, los carriles 5 y 6 corresponden al supuesto padre (ADN en solución y disco de papel FTA respectivamente), el control positivo (+) y el negativo (-).

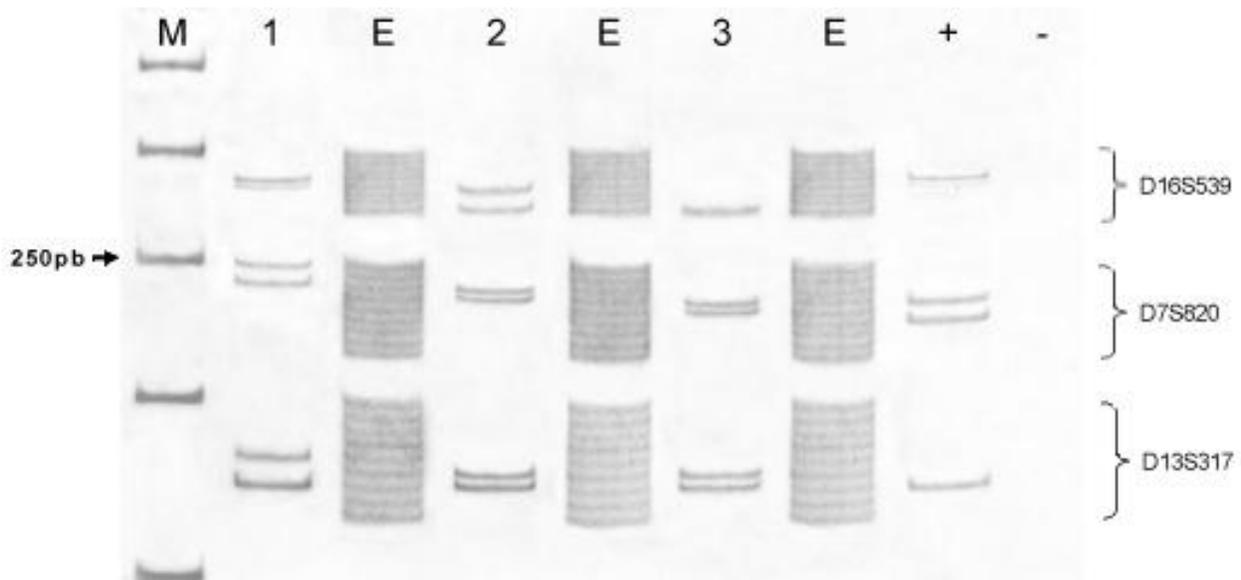


Figura 16. Sistema multiplex para el segundo trío. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb, El carril E corresponde a los marcadores alélicos, el carril 1 corresponde a la madre, el carril 2 al hijo, el carril 3 corresponde al supuesto padre, el control positivo (+) y el negativo (-).

Una vez que se obtuvieron los alelos para cada uno de las 11 regiones STRs de cada individuo de los dos tríos, no se detectaron inconsistencias genéticas en ninguno de los tríos por lo que se elaboraron los valores de índice paternidad para cada locus basándose en las frecuencias alélicas de cada locus en la población de Hispano-América (Apéndice 4), así como el índice combinado de paternidad, la probabilidad de la paternidad y la comparación de ésta con los criterios de Hummel.

Índice de Paternidad (IP)

El cálculo del índice de paternidad se representa con la siguiente formula:

$$IP = \frac{(X) (Y^*) + (X^*) (Y)}{(X) (Z^*) + (X^*) (Z)}$$

Para el locus LPL del primer trío se tienen los siguientes alelos para cada individuo:

Locus LPL	
Madre	10,11
Hijo	10,10
Supuesto padre	10,12

De tal manera que sustituyendo la formula por las probabilidades de herencia y frecuencias alélicas, y reduciendo la expresión se obtiene:

$$IP_{LPL} = \frac{(0.5) (0.5) + (0.5) (0.5)}{(0.5) (\text{frecuencia alelo 10}) + (0.5) (\text{frecuencia alelo 10})} =$$

$$IP_{LPL} = \frac{0.5}{\text{frecuencia alelo 10}} = \frac{0.5}{0.502} =$$

$$IP_{LPL} = 0.996015936$$

El cálculo para el IP debe realizarse para cada uno de los locus que se analizaron. Y básicamente establece cuántas veces es más probable que una persona en particular reciba el alelo del hombre analizado en contra de la probabilidad de que el mismo alelo haya sido heredado por cualquier otra persona aleatoria en la población.

Índice Combinado de Paternidad (ICP)

El índice combinado de paternidad es el múltiplo de todos los IP calculados. Es el producto que evalúa la información genética obtenida en todos los loci analizados. El ICP es la medida de la fuerza de la evidencia genética. Indica si la evidencia ajusta mejor con la hipótesis de que el hombre estudiado es el padre o con la hipótesis de que alguien más es el padre. Expresa el “ajuste” relativo de los datos genéticos a las hipótesis de paternidad o no paternidad.

Probabilidad de Paternidad (PP)

La probabilidad de paternidad se representa como:

$$PP = \frac{ICP}{ICP + 1} \times 100$$

La probabilidad de paternidad es una forma matemáticamente rigurosa para expresar y entender el significado de los resultados genéticos, esta indica la probabilidad que tiene ese individuo de ser el padre biológico, comparado con un hombre al azar de la población. Este resultado se compara con los criterios de Hummel (Tabla 5).

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Resultados de los alelos de las 11 regiones STRs para cada individuo y cálculos estadísticos para el primer trío.

Locus STR	Alelos			IP	ICP	Criterios de Hummel
	Madre	Hijo	Supuesto padre			
1. vWA	16,18	16,18	16,18	2.146	272,612.8446	Criterios de Hummel
2. F13B	9,10	10,10	8,10	1.150		
3. LPL	10,11	10,10	10,12	0.996	PP	Criterios de Hummel
4. FESFPS	11,12	11,11	11,11	1.106		
5. TPOX	8,11	10,11	10,11	9.091	99.99963317%	Paternidad prácticamente probada
6. TH01	6,7	6,8	8,9,3	4.673		
7. F13A01	3,2,4	3,2,6	6,6	3.049	99.99963317%	Paternidad prácticamente probada
8. CSF1PO	10,11	9,11	9,9	15.152		
9. D16S539	9,13	9,9	9,10	2.924	99.99963317%	Paternidad prácticamente probada
10. D7S820	12,13	10,12	10,12	1.923		
11. D13S317	11,13	10,13	10,12	9.091	99.99963317%	Paternidad prácticamente probada

Tabla 11. Resultados de los alelos de las 11 regiones STRs para cada individuo y cálculos estadísticos para el segundo trío.

Locus STR	Alelos			IP	ICP	Criterios de Hummel
	Madre	Hijo	Supuesto padre			
12. vWA	17,18	16,17	16,17	1.656	185,828.468	Criterios de Hummel
13. F13B	9,9	9,9	9,9	1.381		
14. LPL	9,13	9,13	9,13	16.129	PP	Criterios de Hummel
15. FESFPS	11,12	10,11	10,11	2.840		
16. TPOX	8,11	8,11	8,9	0.620	99.99946186%	Paternidad prácticamente probada
17. TH01	7,9	7,9	7,8	1.229		
18. F13A01	4,7	6,7	6,7	3.049	99.99946186%	Paternidad prácticamente probada
19. CSF1PO	10,11	11,11	11,13	1.661		
20. D16S539	11,12	8,11	8,8	26.316	99.99946186%	Paternidad prácticamente probada
21. D7S820	12,14	11,12	10,11	1.923		
22. D13S317	9,11	9,10	9,10	9.091	99.99946186%	Paternidad prácticamente probada

8. DISCUSIÓN

En la actualidad, para garantizar una correcta comparación de resultados interlaboratorio, la comunidad forense ha realizado un enorme esfuerzo para la estandarización no solo de las técnicas de análisis sino también de los marcadores a utilizar, nomenclatura y valoración estadística de los resultados. En este proceso han intervenido diversas organizaciones tales como la TWGDAM (Technical working group on DNA analysis and methods) en Estados Unidos, la EDNAP (European DNA Profiling group) y la ENFSI (European network of forensic science institutes) en Europa, así como las actividades de los distintos grupos de trabajo de la ISFG (International Society for Forensic Genetics) entre las que destaca la elaboración de ejercicios colaborativos con numerosos laboratorios involucrados, en los que participan anualmente mas de 100 laboratorios de Hispanoamérica. Todas estas actividades se encuentran coordinadas por la “DNA Comission” de la ISFG, que regularmente emite recomendaciones sobre el análisis de individualización de ADN en la pericia forense (Farfán, 2006).

El principal propósito de este estudio fue estandarizar los protocolos basados en la amplificación y separación de 11 STRs en la identificación humana con el fin de exclusión de paternidad mediante técnicas reproducibles en el laboratorio de investigación, por lo que es importante lograr un resultado válido y reproducible, evitando al máximo el uso de reactivos tóxicos y costosos además de evitar el uso de equipos costosos como el secuenciador. Estos protocolos además pueden servir como base para posteriores estudios como pueden ser en la determinación de las frecuencias alélicas en la población metropolitana de México de ciertos STRs tales como LPL, F13B, F13A01 y FESFPS, que solo se encuentran reportados por promega para la población de Hispanoamérica (Benjamin *et al.*, 2002), una aplicación posterior sería la de detectar el porcentaje de hererocigocidad y homocigocidad de otros marcadores en alguna región de la población mexicana, entre otros estudios.

El proceso de estandarización de un método permite estudiar las condiciones y requisitos prácticos que influyen en el resultado final de una prueba. Este conjunto de estudios deben reunir los requisitos para la aplicación de la técnica, este proceso requiere de un entorno que garantice la seguridad de los resultados obtenidos en cuanto a la verificación de los instrumentos de medición, control del equipamiento y otros requisitos prácticos que influyen en

el resultado final, lo cual genera un arduo trabajo. Este conjunto de estudios constituye la antesala de la valoración que como proceso complejo, establece que las características determinadas previamente reúnen los requisitos para la aplicación de esta técnica (Martínez *et al.*, 2003).

En este trabajo se describe la estandarización de los diferentes protocolos para el uso de los kits comerciales que permiten detectar 11 diferentes STRs para la identificación humana. Es importante indicar que las condiciones optimas no son las mismas de laboratorio a laboratorio, de hecho es muy común que en algunos casos no se logre la reproducibilidad de las técnicas cuando existen variaciones en la temperatura del medio ambiente, altitud, presión, cuando se utiliza equipo e instrumental diferente, hasta cuando el personal que realiza la prueba es diferente (Martínez *et al.*, 2003). Al montar esta técnica surgieron diferentes problemas, en este trabajo se describe la forma en como se abordaron para solucionarlos.

Es importante mencionar que los protocolos recomendados por promega para el empleo de los kits esta diseñado para usar ciertos modelos de equipos, así como material y reactivos, que las mismas casas comerciales ofrecen y algunas de las cuales generan un alto costo, sin embargo en este proyecto se demostró que diversos procedimientos y productos se pueden reemplazar con el material y equipo disponible en un laboratorio, lo que reduce el costo para cada prueba, además de optimizar el tiempo utilizado en la elaboración de los protocolos así como el rendimiento de cada kit, disminuyendo la generación de desechos químicos que en algunos casos son tóxicos.

Durante este proceso en los primeros ensayos se utilizó una cantidad alta de ADN (231.5 ng) debido a que durante las tinciones de los geles con nitrato de plata (primera y segunda variante) tanto en condiciones desnaturalizantes como en las no desnaturalizantes no se detectaba una buena amplificación (Figuras 5, 6 , 7 y 8), esto pudo deberse a la diferencia en la eficiencia del termociclador o bien a que algunos de los reactivos utilizados no funcionara. Para evaluar si el producto de PCR no se había generado o era el sistema de detección (tinción) lo que permitía la observación de los amplicones se probaron otras tinciones, además se analizaron diferentes concentraciones de acrilamida en el gel y se evaluó si modificando las condiciones reductoras del gel se obtenían mejores resultados (Figura 7 y 8). Los resultados óptimos se obtuvieron cuando no se desnaturalizó el ADN (sin urea), esta modificación permitio una importante reducción en el costo de los reactivos, dado que cada gel requería de 25 g de urea para

desnaturalizar el ADN, en estas condiciones se optimizó el corrimiento electroforético y al utilizar el ADN de doble cadena incrementó la sensibilidad de la detección (Figura 9 y 10). Otra modificación importante fue el teñir los geles con bromuro de etidio ya que requería de un menor tiempo y reactivos por lo que generaba pocos desechos, esta tinción permitió una mejor visualización de los resultados. La concentración óptima de acrilamida para los geles fue de 8 y 10%, sin embargo se decidió utilizar el 8% debido a que generaba una muy buena separación de los amplicones sobre todo en las regiones de menor peso molecular (LPL, vWA, F13B y TH01) y una moderada en las regiones mas pesadas (CSF1PO, F13A01, FESFPS, TPOX y multiplex) con un tiempo de electroforesis de 90 a 130 minutos (Tabla 8), durante estos ensayos se probó una tercer variante de la tinción con plata modificada en el laboratorio de bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, misma que se utilizó en un gel pequeño debido a que requería menor volumen de cada solución, con esta tinción se mejoró la visualización de los resultados con menor cantidad de ADN amplificado (Figura 12), el único inconveniente fue que el tiempo para llevar la tinción de un gel fue de aproximadamente 5.5 h además de requerir mayor cantidad de reactivos comparado con las tinciones de plata del kit (primera variante) que lleva en la tinción aproximadamente de 2 h y la segunda variante (Sambrook *et al.*, 1989) de aproximadamente 1 h, debido a esto fue mas practico y rápido usar la tinción con bromuro de etidio que lleva 5 minutos de tinción dando buenos resultados.

Usando la tinción con bromuro de etidio se observó que existía una buena amplificación con 7 ng de cada muestra en comparación con concentraciones más altas debido a que las bandas aparecían mas intensas y gruesas, por lo que resultaba difícil de compararlas con el patrón alélico y en algunos casos como en las regiones mas pesadas donde la distancia de cada banda era mas corta eran muy difíciles de asignar, otra opción que podría resolver el problema era la de usar la misma cantidad de ADN muestra y reducir el número de ciclos de la amplificación, sin embargo no fue necesario debido a que se obtuvieron buenos resultados utilizando 7 ng de ADN y las condiciones originales de ciclaje descritas por Promega.

Durante los ensayos en la estandarización se originaron algunos problemas, uno común fue la presencia de algunos inhibidores que generaban una amplificación pobre o casi nula, en particular con las muestras en los discos de papel FTA, pero se eliminaron volviendo a limpiar y preparar nuevos discos de papel FTA. Una ventaja de estas técnicas es su alta sensibilidad, por lo que es muy fácil que se presenten contaminaciones (Innis *et al.*, 1990; Rapley, 2000; While, 1993), la mayor dificultad que se tuvo en la mayoría de los casos, fue precisamente la

contaminación con productos de amplificación provenientes del patrón alélico, para eliminar esta contaminación se requirió de altas medidas de limpieza lavando todo el material y equipo de amplificación con hipoclorito de sodio al 5% y etanol al 70% y un posterior tratamiento de todo el material con luz ultravioleta durante 12 h, así como el uso de reactivos nuevos y el uso de batas diferentes en la zona donde se monta la amplificación y en la zona donde se analizan los productos de PCR.

Una vez concluido el proceso de estandarización se probó esta técnica en dos tríos (constituídos por el supuesto padre, la madre y el hijo) donde se tenía alguna duda sobre el parentesco del hijo con su padre, la razón de haber usado esta técnica en estos dos casos fue porque solo se quiso valorar si la prueba generara resultados adecuados en muestras de personas y no solo con los controles del kit.

En estos ensayos no se encontró ninguna incompatibilidad genética del hijo con el supuesto padre para los dos tríos, la comparación directa de los alelos del hijo y el padre con el patrón alélico, para evaluar si comparten algún alelo, tiene una desventaja dado que se presenten errores tales como la asignación de un alelo que no posee alguna persona o cuando se asume la homocigocidad de una persona cuando en realidad posee un alelo diferente que no se amplificó (Valentin, 1980), esto puede ser una desventaja importante en estos protocolos ya que en ciertos casos los alelos son difíciles de asignar en regiones donde las bandas del patrón alélico están poco separadas, tales como son las regiones D16S539, CSF1PO y F13A01.

El poder de exclusión a-priori que poseen los marcadores utilizados es mayor del 99.86 %, todas las posibles combinaciones de los alelos de las 11 regiones es de 2.46×10^{17} (Promega, 2008), lo que indica el poder de individualización que tienen estos marcadores en conjunto, sin embargo es importante mencionar que el empleo de un número mas alto de marcadores genera mayor poder de exclusión, esto depende de la cantidad de marcadores que se usan y que tan polimórfico es cada marcador (Farfán, 2006; Vallejo, 2006), por ejemplo dentro de los marcadores utilizados en este trabajo el marcador mas polimórfico es F13A01 con 14 alelos, sin embargo en los laboratorios forenses se utilizan marcadores como el D18S51 con 26 alelos o el FGA con 39 alelos (Promega, 2008), los que aumentan la probabilidad de exclusión. Sin embargo los marcadores utilizados en este trabajo demuestran que tienen un alto poder de exclusión ya que en los dos tríos se dio como resultado una probabilidad de paternidad de 99.9997% para el primer trío y 99.9994% para el segundo, además de que los marcadores con

pocos alelos son mas fáciles de separar y analizar en geles de poliacrilamida, que con lo que sería por ejemplo un marcador como el FGA.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una adecuada estandarización de los protocolos ya que cumplió con el fin de diferenciar un individuo con otro y adjudicar la paternidad con un nivel de confianza extraordinariamente alto.

Los marcadores de ADN más utilizados en los análisis de genética forense basados en el método de PCR, sin duda son los STRs debido a las grandes ventajas que poseen frente a otros marcadores tales como los VNTRs, ya que son susceptibles de analizarse a partir de muestras con muy pequeñas cantidades de ADN y con restos de ADN de baja calidad, como restos óseos deteriorados (Pastore *et al.*, 1996; Vallone *et al.*, 2008; Vallejo, 2006). La gran precisión en la caracterización del tamaño de los alelos de los marcadores STRs y la rapidez de la técnica son las principales características por las cuales son los marcadores de elección (Vallejo, 2006; Vallone *et al.*, 2008; Kondopoulou *et al.*, 2001). En el campo judicial, existe una clara convicción que el análisis del ADN mediante STRs es indiscutiblemente la prueba material mas evidente que existe en la actualidad (González *et al.*, 2005), sin embargo estos marcadores no se utilizan únicamente para identificación y la asignación de parentesco, también tienen diferentes aplicaciones en ramas de la biología ambiental que van desde la filogenia, en donde la estructura molecular y variabilidad genética de los STRs se han empleado en estudios de evolución de una gran variedad de especies silvestres, como las aplicaciones filogeográficas de los STRs, donde la estructura de la población se observa sobre una larga escala geográfica, hasta llegar a ámbitos de diversidad genética, análisis filogenéticos, mapeo genético, entre muchos otros estudios, generalmente apuntando a la conservación de las especies (Christiakov *et al.*, 2006; Arian, 1999; Sharma *et al.*, 2007). Por otro lado, en la epidemiología y patología molecular la inestabilidad genómica de los microsatélites se utilizan extensivamente en el campo de la carcinogénesis donde ocurren nuevos arreglos cromosomales, por ejemplo translocaciones, inserciones y deleciones de regiones genómicas (Christiakov *et al.*, 2006), o donde algunos microsatélites se asocian con diferentes tipos de cáncer (Subirana-Messeguer, 2008), por lo tanto no se puede reducir a solo algunos ámbitos y estudios el potencial de estos marcadores que aún no han podido ser explicados de manera satisfactoria (Coello, 2001).

9. CONCLUSIONES

- La cantidad de ADN óptima para la amplificación de los microsatélites es de 7 ng por el método de fenol-cloroformo-álcool isoamílico, mientras que para la extracción con papel FTA Whatman fue de solo un disco de 1.2 mm (5 a 20 ng de ADN).
- Los resultados obtenidos con los dos métodos de extracción de ADN son prácticamente iguales, sin embargo para la extracción de ADN en tarjetas FTA se requiere un menor tiempo y cantidad de reactivos.
- Las características óptimas para el corrimiento de los geles de poliacrilamida son: en condiciones no desnaturizantes, a una concentración del 8%, además los geles deberán tener una dimensión de 16 x 16 cm x 0.5 o 0.75 mm para las regiones CSF1PO, F13A01, F13B, FESFPS, LPL, TH01, TPOX y vWA y de 16 x 20 cm x 0.5 o 0.75 mm para el multiplex (D16S539, D7S820 y D13S317), con un tiempo de electroforesis que va desde 90 a 130 minutos con un voltaje de 300V y 40 mA.
- La mejor visualización de las bandas en el gel se obtuvo con la variante de la tinción de nitrato de plata modificada por el laboratorio de bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y con la tinción de bromuro de etidio.
- El empleo de los 11 microsatélites simultáneamente dan como resultado un poder de exclusión mayor al 99.86% en las pruebas de paternidad con una combinación de los alelos de los 11 microsatélites de 2.46×10^{17} lo que indica el enorme poder de individualización que poseen estos marcadores cuando se utilizan simultáneamente para este tipo de pruebas. Por lo que el empleo de esta técnica permite evitar el uso de equipo costoso, como el secuenciador, para realizar este tipo de pruebas dando resultados confiables y reproducibles.

10. REFERENCIAS

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., (2002), "Biología Molecular de la Célula", Editorial Omega, Barcelona España, 1387 p.

Al-soud W. A., Johnsson L. J., Radostrono P., (2000), "Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR", *Journal of clinical Microbiology* 38: 345-350.

Arian F. A. S., (1999), "Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes", *Genetics & Development* 9: 657-663.

Avers J. C., (1991), "Biología celular", Grupo Editorial Iberoamérica, México D. F., 748 p.

Brown W. V., Bertke E. M., (1979), "Citología", Editorial Omega, Barcelona España, 529 p.

Burgoz P. W., Rosero G. C., Cárdenas H. H., Solarte P. C., (2007), "Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae)", *Revista Colombiana de Ciencias pecuarias*, 20(1).

Callen J. C., (2000), "Biología celular: de las moléculas a los organismos", Editorial Continental, París Francia, 488 p.

Christiakov D. A., Hellemans B., Volckaert F. A. M., (2006), "Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics", *Aquaculture* 255: 1-29.

Coello C. C. A., Reyes D. R., Lugo G. H. G., Sandria R. J. C., (2001), "El misterio de los intrones", *Revista Digital Universitaria UNAM*, 2(3): 1-11.

Côté A., Landry M., Rochette S., Gibson K., Lapointe M., Sarafian V., (2008), "Automated DNA extraction from large volumes", *Forensic Science International: Genetics supplement Series*, 1(1): 22-23.

D'Aiuto L., Barsanti P., Cserpan I., Minardi G., Ciccicarece S., (2003), "A patchwork interspersed sequence is present in a high copy number in the sheep genome", *Gene* 303: 69-76.

Darling D. C., Brickell P. M., (1994), "Nucleic acid blotting: the basics", Editorial I. R. L. Press, U. S. A., 111 p.

Dieffenbach C. W., Duesler G. S., (2003), "PCR primer: a laboratory manual", Editorial Cold Spring Harbor, Laboratory press, New York, 520 p.

Edwards A., Civitello A., Hammond H. A., Caskey C. T., (1991), "DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats", *American Journal Human Genetics*, 49: 746-756.

Entrala E., (2000), "Técnicas de análisis de ADN en genética forense", Laboratorio de ADN forense, Departamento de Medicina Legal, Universidad de Granada España.

Farfán E. M. J., (2006), "Introducción a la tecnología del ADN aplicada en el laboratorio forense", Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla España.

Fragoso C. P., (1999), "La genética forense como prueba pericial para la identificación de individuos", tesis de licenciatura UNAM, FES Aragón.

Franke N., Augustin C., Püschel K., (2008), "Optimization of DNA-extraction and typing from contact stains", Forensic Science International: Genetic supplement Series 1: 423-425.

Freifelder D., (1991), "Técnicas de bioquímica y biología molecular", Editorial Reverté, México, 631 p.

Gascón A. M., (2007), "Validez y valor de las pruebas científicas: La prueba del ADN", U.C.L.M., 26(5): 1-12.

Giovambattista G., Ripoli M. V., Lirón J. P., Kienast M. E., Villegas E. E., Castagnaso, Dulout F. N., Peral G. P., (2001), "Aplicación de las técnicas de polimorfismo de DNA en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad", Analecta Veterinaria, 21 (1): 5-11.

González A. F., Sánchez D., Begoña M. J., (2005), "Análisis de 2,758 casos de paternidad resueltos con polimorfismos STR-PCR en Ecuador", Ciencia Forense, 1(7): 205-216.

González A. F., Sánchez D., Begoña M. J., (2005), "El estudio de polimorfismos de ADN a partir de restos óseos y dientes y sus aplicaciones en la identificación de desaparecidos", Ciencia Forense, 1(7): 163-181.

González B. J. M., (1988), "Bioquímica para técnicas de laboratorio", Editorial Marban, Madrid España, 327 p.

Goodenough U., (1981), "Genética", Ediciones Omega, Barcelona España, 824 p.

Hakan C., Rannug U. L. F., (2006), "Mechanisms of human minisatellite mutation in yeast", Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 598 (1-2): 132-143.

Hammes B. D., Hooper N. M., (2000), "Biochemistry", Editorial Springer, Nueva York, 422 p.

Helminen P., Sajantila A., Johnsson V., Lukka M., Ehnholm C., Peltonen L., (1992), "Amplification of three hypervariable DNA regions by polymerase chain reaction for paternity determination: comparison with conventional methods and DNA fingerprinting", Molecular and Cellular Probes 6: 21-26.

Hicks G. J., (2000), "Bioquímica", Editorial McGraw-Hill Interamericana, México D. F., 900 p.

Hicks J. J. G., (2006), "Bioquímica", Editorial Mc Graw Hill, México, 887 p.

Hummel K., Gerchow J., (1981), "Biomathematical evidence of paternity", Berlin: Springer-verlag.

Iniesta R., Guinó E., Moreno V., (2005), "Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies", *Gac Sanit*, 19(4): 333- 341.

Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., (1990), "PCR protocols", Editorial Academic press, Nueva York, 482 p.

Jacewicz R., Miscicka S. D., (2006), "Population genetic study of the three minisatellite loci: D7S21, D12S11 and D5S110 in Poland", *International Congress Series*1288: 406-408.

Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985), "Hypervariable minisatellite regions in human DNA", *Nature* 314: 67-73.

Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985), "Hypervariable minisatellite regions in human DNA", *Nature* 314: 76-79.

Jiménez C. E., (2004), "Manual de técnicas de biología molecular básica", Editorial Prado, México D. F., pp. 607

Jiménez G. L. F., Merchant L. H., (2003), "Biología celular y molecular", Editorial Pearson Educación, México D. F., 853 p.

Karp G., (1987), "Biología celular", Editorial McGraw-Hill, Florida, 950 p.

Krenke E. B., Tereba A., Anderson S., Buel E., Culhane S., Finis C., Tomsey C. S., Zachetti J. M., Masibay A., Rabbach D. R., Amato E. A., Sprenger C. J., (2002), "Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system", *Journal Forensic Science* 47(4): 773-785.

Kochl S., Niederstatter H., Parson W., (2005), "DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR", *Methods of Molecular Biology*, 297: 13-30.

Kondopoulou H., Kouvatzi A., Triantaphyllidis C., (2001), "Forensic evaluation of 10 STRs and two minisatellite loci in the Greek population", *Forensic Science International* 124(2-3): 228-230.

Landsteiner K., (1900), "Ueber heterogentisches Antigen und Hapten", *Biochem Zeitsch*, 119: 294-306.

Laperche S., Huffel V. V., Rouger Ph., Salmon Ch., (1991), "Etude par les fragments de restriction (RFLP) du polymorphisme de l'ADN en criminologie: analyses quantitative et qualitative à partir de sang et de sperme séchés sur différents supports", *Revue Française de Transfusion et d'Hémodiologie* 34(2): 139-150.

Lennie P. B., (1999), "El análisis de ADN para pruebas de paternidad e identificación forense", *Acta Científica Venezolana*, 50: 24-28.

Levedakou, E.N., *et al.*, (2001), "Allele frequencies for fourteen STR loci of the PowerPlex™ 1.1. and 2.1 multiplex systems and Penta D locus in caucasians, african-americans, hispanics, and other populations of the United States of America and Brazil", *Journal Forensic Science* 46(6): 736-761.

Levinson G., Gutman G. A., (1987), "Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution", *Molecular Biology Evolution* 4: 203–221.

Lins, A.M., *et al.*, (1998), "Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system", *Journal Forensic Science* 43: 1168-1180.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., (2003), "Biología celular y molecular", Editorial Medica Panamericana, Madrid España, 1084 p.

Lorente A. M., Lorente A. J. A., Villanueva C. E., (1994), "La medicina clínica ante los indicios criminales biológicos y la identificación genética", *Medicina Clínica*, 102: 115-118.

Makalowski W., (2001), "The human genome structure and organization", *Acta Biochimica Polonica* 48(3): 587-598.

Maldonado A. M., Jorrín N. J., (2007) "Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida: análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*", Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba España.

Martínez I., Padrón M., Cabrera R., Acosta M., Pino Y., González Y., Martínez M., Bracho G., Aranguren Y., Fernández Y., Pérez J. L., González M., Esnard S. C., Cedré B., García L., (2003), "Estandarización de los métodos electroforéticos en geles de poliacrilamida en el Phast System y cromatográficos para la caracterización de nuevos antígenos vacunales y componentes de medio de cultivo", *VacciMonitor* 1(12): 1-8.

Mattick S. J., (2004), "Los intrones", *Investigación y Ciencia* (1): 26-33.

May C. A., Tamaki K., Neumann R., Wilson G., Zagars G., Pollack A., Dubrova Y., Jeffreys A., Meistrich M. L., (2000), "Minisatellite mutation frequency in human sperm following radiotherapy" *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 453(1,20): 67-75.

Meyerson M., (2003), "Human genetic variation and disease", *The Lancet*, 362: 359-360.

Minch M. J., (1989), "Experiments in biochemistry: projects and procedures", Ed. Prentice Hall, Estados Unidos, 334 p.

Moraga M., Aspillaga E., Santoro C., Standen V., Carvallo P., Rothhammer F., (2001), "Análisis de ADN mitocondrial en momias del norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas", *Revista Chilena de Historia Natural* 74:719-726.

Narkuti V., Vallanki N. R., Anubrolu N., Doddapaneni K. K., Kaza P. C. G., Mangamoori L. N., (2008), "Single and double incompatibility at vWA and D8S1179/D21S11 loci between mother and child: implications in kinship analysis", *Clinica Chimica Acta* doi: 10.1016/j.cca.2008.04.022.

Narkuti V., Vellanki R. N., Gandhi K. P. C., Doddapaneni K. K., Yelavarthi P. D., Mangamoori L. N., (2007), "Microsatellite mutation in the maternally/paternally transmitted D18S51 locus: Two cases of allele mismatch in the child", *Clinica Chimica Acta*, 381: 171-175.

Näslund K., Saetre P., Salomé J. V., Bergström T. F., Jareborg N., Jazin E., (2005), "Genome-wide prediction of human VNTRs", *Genomics* 85: 24-35.

Nelson D. L., Cox M.M., (2001), "Principios de bioquímica", Editorial Omega, Barcelona España, 589 p.

Nelson P. L., Cox M. M., (2005), "Principles of biochemistry", Quinta edición, Editorial W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1119 p.

Otieno A. C., Carter A. B., Hedges D. J., Walker J. A., Ray D. A., Garber R. K., Anders B. A., Stoilova N., Laborde M. E., Fowlkes J. D., Huang C. H., Perodeau B., Batzer M. A., (2004), "Analysis of the Human *Alu* Ya-lineage", *Journal of Molecular Biology* 342(1): 109-118.

Pastore L., Vuttariello E., Sarrantonio C., Coto I., Roviello S., Fortunato G., Salvatore F., Sacchetti L., (1996), "Allele frequency distributions at several variable number of tandem repeat (VNTR) and short tandem repeat (STR) loci in a restricted Caucasian population from south Italy and their evaluation for paternity and forensic use", *Molecular and Cellular Probes*, 10: 299-308.

Pena S. D. J., Chakraborty R., (1994), "Paternity testing in the DNA era", *TIG* 10(6): 204-209.

Petkovski E., Keyser C., Ludes B., Hienne R., (2003), "Validation of SNPs as markers for individual identification", *International Congress Series* 1239: 33-36.

Philippe J. B., (2003), "Hypermutable minisatellites, a human affair?", *Genomics* 81(4): 349-355.

Piazza F., Liò P., (2005), "Statistical analysis of simple repeats in the human genome", *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 347(1): 472-488.

Pineda B. L., (1999), "El análisis de ADN para pruebas de paternidad e identificación forense", *Acta Científica Venezolana* 50: 24-28.

Rapley R., (2000), "The nucleic acid protocols handbook", Editorial Humana Press, Nueva Yerse, 1050 p.

Rendina G., (1974), "Técnicas de bioquímica aplicada", Editorial Interamericana, México, 280 p.

Rengarajan K., Cristol S. M., Mehta M., Nickerson J. M., (2002), "Quantifying DNA concentrations using Xuorometry: a comparison of Xuorophores", *Mol. Vis.* 8: 416-421.

Robertis E. D. P., Saez F. A. F., Robertis E. M. F., (1978), "Biología celular", Editorial El Ateneo, Buenos Aires Argentina, 528 p.

Rocheta M., Dionísio F. M., Fonseca L., Pires A. M., (2007), "Paternity analysis in Excel", *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 88: 234-238.

Salmela E., Lappalainen T., Fransson I., Andersen P. M., Wright K. D., Fiebig A., Sistonen P., Savontaus M. L., Schreiber S., Kere J., Lahermo P., (2008), "Genome-wide analysis de single nucleotide polymorphisms uncovers population structure in northern Europe", *PLOS One* 3(10): 1-9.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), "Molecular cloning: a laboratory manual", Editorial Cold Spring Harbor Laboratory press, Estados Unidos, 787 p.

Saremi M. A., Saremi M., Tavallaei M., (2008), "Rapid genomic DNA extraction (RGDE)", *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1(1): 63-65.

Sharma P. C., Grover A., Kahl G., (2007), "Mining microsatellites in eukaryotic genomes", *Trends in Biotechnology* 25(11): 490- 498.

Sirchia S. M., Garagiola I., De Andreis C., Gazzoli I., Gramegna M., Colucci G., (1996), "Characterization of four microsatellites in an Italian population and their application to paternity testing", *Molecular and Cellular Probes*, 10: 155-158.

Subirama J. A., Messeguer X., (2008), "Structural families of genomic microsatellites", *Gene* 408: 124-132.

Túnez F. I., (2002), "Electroforesis: electroforesis en papel de proteínas séricas", Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba España.

Valentin J., (1980), "Exclusions and attributions of paternity: practical experiences of forensic genetics and statistics", *Human Genetics* 32: 420-431.

Vallejo T. G., (2006), "La investigación biológica de la paternidad", Instituto de Toxicología y de Ciencias Forenses, Departamento de Madrid España.

Vallone P. M., Hill C. R., Butler J. M., (2008), "Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci", *Forensic Science International: Genetics* 26: 52-58.

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., (2001), "The sequence of the human genome", *Science* 291:1304-1351.

Wang W., Chen K., Xu C., (2006), "DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument", *Analytical Biochemistry* 356: 303-305.

Wehr T., Rodríguez D. R., Zhu M., (2000), "Capillary Electrophoresis of proteins", Editorial Marcel Dekker, I.N.C., Nueva York, 286 p.

Wenk R. E., Gjertson D. W., Chiafari F. A., Houtz T., (2005), "Statistical analysis in forensic genetics", *Transfusion* 45: 440-444.

White B. A., (1993), "PCR protocols", Editorial Humana press, New Jersey, pp. 392.

Yamaguchi K. Y., Nakazono K., Takahashi A., Saito S., Hosono N., Kubo N., Nakamura Y., Kamatani N., (2008), "Japanese Population Structure, Based on SNP Genotypes from 7003 Individuals Compared to Other Ethnic Groups: Effects on Population-Based Association Studies", *The American Journal of Human Genetics* 83(4): 445-456.

Yu H. A., Zhang L. L., Xu C. J., (2005), "An improved protocol for low copy number plasmid DNA purification with diatomaceous earth", *Chinese Journal Cell Biology* 27: 679-683.

11. APÈNDICES

APÈNDICE 1

Preparación de la mezcla de reacción

- Todos los componentes de los kits deben almacenarse a -20°C y antes de utilizarse deben descongelarse, mezclar en vortex por 10 segundos antes de usarse y mantenerse en hielo.

Mezcla de reacción		
Componentes	Cantidad μ l	Composición
Agua estéril	7.4	----- 500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 9.0) a 25°C, 15mM MgCl ₂ , 1% Triton y 2mM de cada dNTP
Amortiguador 10X	1.25	-----
10X primers	1.25	-----
Taq polimerasa cetus	0.1	-----
Volumen final	10	-----

APÈNDICE 2

Preparación de la solución de carga

- Para los componentes TRIS y EDTA se preparan soluciones stock con agua bidestilada estéril.

Solución de carga	
TRIS 2M pH 8	500 μ l
EDTA 0.5M pH 8	3 ml
SDS 0.5%	1 ml
Ficoll 10%	2 g
Sacarosa 30%	6 g
0.2% azul de bromofenol y xilen-cyanol	
Agua bidestilada estéril	Afora a 20 ml

APÈNDICE 3

Preparación del gel de poliacrilamida

- Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada estéril y almacenan a 4°C.
- La solución stock de acrilamida-bis-acrilamida 30% se almacena en un frasco ámbar y en la oscuridad.

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g
Agua bidestilada	Llevar a 100 ml

- El persulfato de amonio (PSA) al 10% se prepara y almacena en tubos eppendorf de 1.5 mL a -20°C, de esta forma la solución puede durar varias semanas.

Persulfato de amonio	5 g
Agua bidestilada	Llevar a 50 ml

- TBE (Tris-ácido Bórico-EDTA) solución stock 10X, se mezclan los reactivos en agua desionizada y una vez disueltos se esteriliza la solución a 120°C por 20 minutos.

TRIS	1 M
Ácido Bórico	1 M
EDTA	50 mM
Agua desionizada	Llevar a 1 litro

- Preparación del gel de poliacrilamida al 8%

Componentes	Volumen	
Agua desionizada	17 ml	20.3 ml
TBE 10X	1.25 ml	1.5 ml
Acrilamida-bis-acrilamida	6.65 ml	8 ml
TEMED	20 µl	24 µl
PSA 10%	175 µl	210 µl
Volumen final	25 ml	30 ml

APÈNDICE 4

Frecuencias alélicas de la población de Hispano-América

	F13A01 ^b	F13B ^b	FESFPS ^b	LPL ^b	CSF1PO ^{b, c}	TH01 ^{a, c}	TPOX ^{a, c}	vWA ^{b, c}	D16S539 ^{b, c}	D7S820 ^{b, c}	D13S317 ^{b, c}	
Alelos												Alelos
3.2	0.225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.2
4	0.113	-	-	-	-	0.012 ^d	-	-	-	-	-	4
5	0.227	-	-	-	0.014 ^d	0.012 ^d	-	-	0.014 ^d	-	-	5
6	0.164	0.051	-	-	0.014 ^d	0.290	0.012 ^d	-	-	0.014 ^d	0.014 ^d	6
7	0.227	0.018	0.002	0.000	0.014 ^d	0.288	0.012 ^d	-	-	0.014 ^d	0.014 ^d	7
8	0.014	0.129	0.012	0.002	0.014 ^d	0.107	0.562	-	0.019	0.152	0.108	8
9	0.000	0.362	0.010	0.029	0.033 ^d	0.119	0.052	-	0.171	0.094	0.169	9
9.3	-	-	-	-	-	0.174	-	-	-	-	-	9.3
10	0.000	0.435	0.176	0.502	0.249	0.107	0.055	-	0.152	0.26	0.055	10
10.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.014 ^d	-	10.3
11	0.007	0.005	0.452	0.224	0.301	0.012 ^d	0.245	0.012 ^d	0.202	0.26	0.218	11
11.1	-	-	-	-	0.014 ^d	-	-	-	-	-	-	11.1
12	0.000	0.000	0.233	0.207	0.331	-	0.079	0.012 ^d	0.268	0.199	0.221	12
13	0.005	-	0.110	0.033	0.055	-	0.012 ^d	0.012 ^d	0.16	0.017	0.155	13
14	0.005	-	0.005	0.002	0.014 ^d	-	-	0.069	0.025	0.014 ^d	0.075	14
15	0.007	-	-	-	0.014 ^d	-	-	0.107	0.014 ^d	-	0.014 ^d	15
16	0.007	-	-	-	-	-	-	0.302	-	-	-	16
17	-	-	-	-	-	-	-	0.267	-	-	-	17
18	-	-	-	-	-	-	-	0.164	-	-	-	18
19	-	-	-	-	-	-	-	0.071	-	-	-	19
20	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-	-	20
21	-	-	-	-	-	-	-	0.012 ^d	-	-	-	21

Frecuencias alélicas para la población Hispano-Americana. Tomado de www.promega.com.

^a Los datos fueron generados como parte de un esfuerzo cooperativo entre Genetic Design, Inc., y Promega Corporation (Lins *et al.*, 1998).

^b Los datos fueron generados como parte de un esfuerzo cooperativo entre The Bode Technology Group y Promega Corporation.

^c Los datos fueron publicados por Levedakou *et al.*, 2001.

^d La mínima frecuencia alélica recomendada por la National Research Council I

