

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FORENSES**



**CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALELICAS
EN POBLACIÓN MESTIZA DE LA REGION ANDINA BOLIVIANA**

POSTULANTE: *Ramón Ubaldo Callisaya Yujra*

TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

La Paz - Bolivia

2007

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO SELADIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FORENSES**



**CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALELICAS
EN POBLACIÓN MESTIZA DE LA REGION ANDINA BOLIVIANA**

POSTULANTE: *Ramón Ubaldo Callisaya Yujra*

ASESORES: *Susana Revollo Z. Ph D.*

Instituto SELADIS

Omar Rocabado C. M.Sc. I.D.I.F.

TESIS DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

La Paz - Bolivia

2007

DEDICATORIA: *Quiero dedicar este trabajo a las personas que aprecio y hacen de mi una persona feliz, a mi esposa Luzmila a mis queridos hijos Carlos y Adriana y sobre todo al ser incondicional que guía mis pasos, a mis padres Ramón y Lucía a mis suegros Sr. Alfonso, Sra. Yolanda, Sr. Felipe y así también expresar mi gratitud y admiración a la Dra. S. Revollo y al Lic. Omar Rocabado por su asesoramiento y guía en la presente investigación.*

AGRADECIMIENTOS

- *Agradecer a Dios por haberme dado esta oportunidad en la vida, por guiar mis pasos y sobre todo por dar la felicidad que solo el puede dar, a mi vida.*
- *Al Instituto SELADIS por haber permitido la realización de este trabajo y constituirse en una institución de apoyo constante a la investigación en nuestro País.*
- *A la Dra. Susana Revollo por haber confiado en mi la realización de este trabajo, gracias por todo su apoyo y consejos sabios y mi mas grande admiración para Ud.*
- *Al Lic. Omar Rocabado por haber confiado en mi para la realización de este trabajo, gracias por toda su paciencia, apoyo y mi mas grande admiración para ti querido amigo,*
- *Al Dr. Daniel Corach un profesional excelente por sus consejos y experiencia en este trabajo. Docente e Investigador en Genética Forense de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires Argentina.*
- *A la Dra. Lisbeth Borjas una profesional aparte de excelente de muy amplia voluntad de colaboración y en particular por sus consejos y apoyo en este trabajo. Docente investigador en Patología Molecular y Ciencias Forenses de la Facultad de Medicina. Universidad Zulla Maracaibo Venezuela.*
- *A mis padres quienes a pesar de todas las dificultades siempre me apoyaron incondicionalmente.*
- *A mi Esposa quien hora tras hora minuto a minuto me dio animo, empuje a seguir adelante. A mis queridos hijos quienes son la luz de mi existencia.*

AUTORIDADES FACULTATIVAS

- *Dra. Willma Strauss*
DECANO FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
- *Dr. Arturo Mallea*
**VICEDECANO FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICA**
- *Dr. Walter Montaña*
JEFE DE CARRERA DE BIOQUIMICA

- **TRIBUNAL**

Dr. Bernardo Torrico A. M.Sc.

**Docente de la cátedra de Anatomía y Citogenética Humana “Facultad de
Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas” U.M.S.A.**

Dr. Sergio Céspedes A.

Fiscal de Materia “Fiscalía General de República” La Paz Bolivia

Dr. Freddy Torrejón

Medico Forense “Instituto de Investigaciones Forenses”

AMBIENTE DE INVESTIGACION

*Servicio de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud SELADIS, Unidad de
Diagnostico y Tipificación Molecular. Universidad Mayor de San Andres U.M.S.A.
Av. Saavedra No. 2224, Tel. 2222436, fax 2224895. La Paz Bolivia.*

*Instituto de Investigaciones Forenses IDIF – Fiscalía General de la República Sucre – Bolivia,
área de Genética Forense.*

RESUMEN.

Bolivia un país en desarrollo, cuya población actual se encuentra próxima a los 9.000.000 de habitantes, distribuidos tanto en la Región Occidental como en la Oriental, donde la composición étnica generalizada es mestiza proveniente de Hispánicos (población caucásica española) y Nativas (población indígena), además de presentar etnias que aun conservan su patrimonio genético intacto.

El propósito de este estudio ha sido el de establecer la primera base de datos de frecuencias alélicas en la Población Mestiza de la región andina Boliviana, evaluando grupos poblacionales de la región mencionada utilizando diversos Sistemas Genéticos mismos que provienen de la línea comercial "Promega" Gene print STR Powerplex, habiendo sido evaluados 9 marcadores genéticos STR (Short Tandem Repeats) útiles en la identificación de individuos y la casuística forense.

El material genético fue obtenido a partir de sangre entera, utilizando el método enzimático orgánico, amplificado por PCR; los productos fueron separados por electroforesis en gel de Poliacrilamida desnaturalizante y revelados mediante tinción argéntica.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico "Power Stat" gentileza de la línea Promega.

La distribución de frecuencias alélicas de una determinada población se considera necesaria a fin de asignar cierto grado de significancia de un match entre dos muestras forenses o para establecer cuanta más posibilidad posee un individuo en compartir alelos con otro, en tal sentido podemos indicar que el marcador representativo en nuestro estudio esta dado por el marcador TPOX alelo 9 y 10 cuya frecuencia alelica es de 0,036, siendo este valor de amplia utilidad en la valoración estadística además de ser un marcador propio de nuestra población.

Dado las variaciones publicadas en relación a las frecuencias alélicas en diferentes poblaciones con distintos Sistemas Genéticos, es sin duda importante estudiar la distribución alélica en la población en la que se establece la duda de identidad con los Sistemas a ser utilizados.

TABLA DE CONTENIDO

		Pag.
I.	Introducción	1
II.	Antecedentes.....	5
2.1	Estructura y función del ADN	7
2.1.1	Transmisión de la información genética.....	8
2.1.1.1	Cromosomas autosómicos	8
2.2	ADN Codificante y ADN no Codificante.....	10
2.2.1	ADN Codificante	10
2.2.2	ADN No Codificante	10
2.3	Polimorfismos del ADN	12
2.3.1	Polimorfismos de Secuencia	13
2.3.2	Polimorfismos de Longitud	14
2.4	ADN Repetido en Tandem	14
2.4.1	ADN Satélite	15
2.4.2	ADN Minisatélite	16
2.4.3	ADN Microsatélite	17
2.5	Evolución de las técnicas de análisis genético.....	18
III.	Marco teórico.....	21
3.1	STRs Repeticiones Cortas en Tandem	21
3.1.1	STR simples o de baja microvariación.....	22
3.1.2	STR compuestos de microvariación Intermedia.....	22
3.1.3	STR Complejos de alta microvariación.....	22
3.2	Estrategias Metodológicas y Análisis de Marcadores Polimórficos.....	25
3.2.1	Condiciones de un buen Marcador Polimórfico.....	26
3.3	El ADN en la Identificación de Individuos	30
3.4	El ADN en la Investigación Criminal	31
3.5	Delitos Contra la Libertad Sexual	32
3.5.1	Agresiones sexuales	32
3.5.2	Colección de Indicios en el cuerpo de la víctima	33
3.6	Cadena de Custodia	33
3.7	Análisis legal de la prueba genética en Bolivia.....	35
3.7.1	Marco jurídico de la prueba del ADN en la Investigación de la Paternidad.....	35
3.7.2	Análisis de la Legislación Vigente en Bolivia.....	37
3.7.2.1	Principales Problemas de Filiación.....	38
3.7.2.2	Medios Probatorios de Filiación.....	40
3.8	Desarrollo de los Métodos de Investigación Biológica de	

	Paternidad.....---	43
3.8.1	Sistema HLA como Método en la Determinación de Paternidad	44
3.9	La Práctica de la Prueba de ADN en Bolivia.....	47
3.9.1	Instituciones Oficiales encargadas de la prueba del ADN en Bolivia.....	48
3.10	Análisis de datos Genéticos Poblacionales.....	49
3.10.1	Consideraciones Generales	49
3.10.2	Parámetros Estadísticos de Interés Forense	51
3.10.2.1	Frecuencias Alélicas	52
3.10.3	Análisis de la Variabilidad Genética	54
3.10.3.1	Herocigoidad	55
3.10.3.2	Índice De contenido Polimórfico	56
3.10.3.3	Probabilidad de Exclusión	56
3.10.3.4	Poder de Discriminación	58
3.10.3.5	Deriva Genética	58
3.11	Análisis de Resultados.....	59
3.11.1	Determinación de Paternidad.....	59
3.11.2	Identificación Criminal.....	62
3.12	Base de Datos Genéticos.....	68
3.12.1	Base de Datos de Frecuencias Alélicas.....	69
3.12.2	Base de Datos de Profesionales en Riezgo.....	71
3.12.3	Base de Datos Judiciales	71
3.12.4	Base de Datos Criminales	72
IV.	Objetivos.....	74
4.1	Objetivos generales.....	74
4.2	Objetivos Específicos	74
V.	Diseño Experimental	75
5.1	Diseño Metodológico	75
5.2	Población	76
5.2.1	Recolección de muestras	76
5.3	Métodos de Investigación	77
5.3.1	Extracción de ADN a partir de Sangre Total (Tipificación STR).....	77
5.3.2	Extracción de ADN a partir de Sangre Total (Tipificación HLA).....	78
5.3.3	Obtención de Perfiles Genéticos por el Método de los STRs.....	78
5.3.3.1	Amplificación.....	78
5.3.3.2	Cuarto Blanco (Preparación del Master Mix).....	78
5.3.3.3	Cuarto Azul (Extracción de ADN Humano)	79
5.3.3.4	Cuarto Gris (Amplificación STR)	79

5.3.3.5	Cuarto Negro (Revelado)	80
5.3.3.5.1	Preparación del Equipo para la Corrida Electroforetica en gel de Poliacrilamida).....	80
5.3.3.5.2	Preparación del Gel Poliacrilamida	81
5.3.3.5.3	Preparación de la cubeta de Electroforesis	82
5.3.3.5.4	Preparación de las Muestras	82
5.3.3.5.5	Cargado de la Muestra	83
5.3.3.5.6	Tinción de Plata	83
5.3.4	Obtención de Perfiles Genéticos de los Sistemas HLA Clase I, II	85
5.4	Análisis Estadístico	85
VI.	Resultados y Discusiones	87
6.1	Obtención de Perfiles Genéticos	87
6.2	Análisis y Obtención de Base de Datos de Frecuencias Alelicasde 9 Loci STR en la Población Meztiza de la región andina Boliviana.....	88
6.3	Análisis y Obtención de Estafísticos Poblacionales en Población Mestiza de la región andina Boliviana.....	102
6.4	Comparación de la Base de Datos de Frecuencias Alelicas en Población Mestiza de la Región andina Boliviana con la Base de Datos HispanoAmericana.....	104
6.5	Análisis y Obtención de Base de Datos de Frecuencias Alélicasdel Sistema HLA Clase I y Clase II En Población Mestiza de la región andina Boliviana.....	113
VII	Conclusiones.....	120
VIII.	Recomendaciones	123
IX	Referencias Bibliográficas.....	125
	Anexos.....	131

INDICE DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1.	Estructura y principales componentes del ADN (Ácido Desoxirribonucleico).....	7
Figura 2.	Representación gráfica de los Ideogramas de cromosomas Metacéntricos, Submetacéntrico y Acrocéntrico.....	10
Figura 3.	Clasificación del ADN repetitivo en el Genoma Humano....	12
Figura 4.	Representación gráfica del polimorfismo de Secuencia del ADN mitocondrial.....	13
Figura 5.	Representación gráfica del ADN repetido en Tándem.....	15
Figura 6.	Corrida Electroforética del Minisatélite DS180.....	17
Figura 7.	Representación gráfica de los STR.....	24
Figura 8.	Clasificación de Polimorfismo de ADN utilizados en Genética forense	29
Figura 9.	Representación Gráfica de una corrida de electroforesis en gel de Poliacrilamida al 4%, donde se observa la corrida de ladder o escaleras alélicas de los 9 loci STR, junto a los controles positivos.....	84
Figura 10.	Perfil genético de ADN de 9 loci STR.....	87
Figura 11.	Sistema CSF1PO; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	88
Figura 12.	Sistema THO1; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	89
Figura 13.	Sistema TPOX; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la región Andina Boliviana.....	91
Figura 14.	Sistema F13A01; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	92
Figura 15.	Sistema FESFPS; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	94
Figura 16.	Frecuencias alélicas del Sistema Vwa en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	95
Figura 17.	Sistema D16S539; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	97
Figura 18.	Sistema D7S820; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	98
Figura19.	Sistema D13S317; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana.....	100
Figura 20.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema CTT, Marcador CSF1PO en población Mestiza de la Región	

	Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	104
Figura 21.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema CTT; Marcador THO1 en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	105
Figura 22.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema CTT, Marcador TPOX en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	106
Figura 23.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema FFv, Marcador F13AO1 en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	107
Figura 24.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema FFv, Marcador FESFPS en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	108
Figura 25.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema FFv, Marcador vWA, en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	109
Figura 26.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR, Marcador D16S539 en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	110
Figura 27.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR, Marcador D7S820, en población Mestiza de la Región andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	111
Figura 28.	Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR, Marcador D13S317 en población Mestiza de la región andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.....	112
Figura 29.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-A de la población estudiada.....	113
Figura 30.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-B de la población estudiada.....	114
Figura 31.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-C de la población estudiada.....	115
Figura 32.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DR de la población estudiada.....	116

INDICE DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1.	Características de Sistemas y marcadores de STR analizados en el presente estudio.....	24
Tabla 2.	Localización cromosómica, secuencias repetitivas de los STR Multiplex.....	28
Tabla 3.	Representación de genotipos posibles versus frecuencias de los mismos.....	53
Tabla 4.	Perfiles genético del Padre alegado, hijo y madre en un caso de Exclusión de Paternidad.....	60
Tabla 5.	Perfiles genético del Padre alegado, hijo y madre en un caso de Inclusión de Paternidad.....	61
Tabla 6.	Temperaturas y Tiempos del proceso de amplificación del PCR-STR Multiplex.....	79
Tabla 7.	Frecuencias alélicas del Sistema CTT para el marcador CSF1PO.....	88
Tabla 8.	Frecuencias alélicas del Sistema CTT para el marcador THO1.....	90
Tabla 9.	Frecuencias alélicas del Sistema CTT para el marcador TPOX.....	91
Tabla 10.	Frecuencias alélicas del Sistema FFv para el marcador F13A01.....	93
Tabla 11.	Frecuencias alélicas del Sistema FFv para el marcador FESFPS.....	94
Tabla 12.	Frecuencias alélicas del Sistema FFv para el marcador vWA	96
Tabla 13.	Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR para el marcador D16S539.....	97
Tabla 14.	Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR para el marcador D7S820.....	99
Tabla 15.	Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR para el marcador D13S317.....	100
Tabla 16.	Base de datos de frecuencias alélicas en Población Mestiza de la Región Andina Boliviana	101
Tabla 17.	Estadísticos poblacionales de 9 loci STR, obtenidos en la Población Mestiza de la Región Andina Boliviana	102
Tabla 18.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-A de la población estudiada.....	113
Tabla 19.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-B de la población estudiada.....	114

Tabla 20.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-C de la población estudiada.....	115
Tabla 21.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DR de la población estudiada.....	116
Tabla 22.	Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DQ.....	117
Tabla 23.	Resultados del desequilibrio de ligamiento y Chi cuadrado.	119

INDICE DE ANEXOS

	<u>Pag.</u>
Anexo 1. Microcentrífuga Ependorf 5414 C.....	131
Anexo 1. Transiluminador de luz UV.....	131
Anexo 2. Termociclador Perkin Elmer GeneAMP.PCR System 9600.....	132
Anexo 2. Campana de trabajo e irradiación UV. PCR	132
Anexo 3. Cámara de secuenciación de ADN de doble ajuste.....	133
Anexo 3. Cámara de secuenciación de ADN (Vista Lateral).....	133
Anexo 4. Set de peines dientes de tiburón.....	134
Anexo 4. Espaciadores, peines dientes de tiburón y placas de vidrio...	134
Anexo 5. Cargado de muestras en la corrida electroforética.....	135
Anexo 5. Cargado múltiple con una micropipeta de ocho entradas en las placas de vidrio.....	135
Anexo 6. Verificación del montaje y las características de seguridad del secuenciador.....	136
Anexo 6. Bandejas de revelado del gel de poliacrilamida.....	136
Anexo 7. Base de datos de frecuencias alélicas en la población afroamericana.....	137
Anexo 8. Base de datos de frecuencias alélicas en la población caucasica americana.....	138
Anexo 9. Base de datos de frecuencias alélicas en la población hispanoamericana.....	139
Anexo 10. Base de datos de frecuencias alélicas en la población paraguaya.....	140
Anexo 11. Base de datos de frecuencias alélicas en la población brasilera.....	141
Anexo 12. Base de datos de frecuencias alélicas en la población colombiana.....	142

I. INTRODUCCION

Desde que el hombre existe, ha intentado nombrar y clasificar al mundo natural del que forma parte, cuyo origen ha sido investigado por historiadores, arqueólogos, lingüistas durante milenios, así también una clasificación más cercana se basó en las características bioquímicas, serológicas como la tipificación del Sistema HLA Clase I y II, teniendo no muy clara la identificación de los individuos debido al bajo nivel de Polimorfismo que presenta cada una de estas y más recientemente la identificación por los métodos moleculares. El análisis de Polimorfismo de ADN ha significado un cambio radical en la investigación Antropológica, análisis de paternidad, así como en los análisis forenses. Esto se debe a que nuestro material genético ADN (Ácido desoxirribonucleico) es una molécula extremadamente informativa considerando que esta ha sido transmitida de nuestros ancestros hacia nosotros, constituyendo un registro de nuestra historia que actualmente y debido al mestizaje ha adquirido una biodiversidad de poblaciones. Es así que se comenzó a manejar conceptos moleculares a nivel del "ADN" con fines de identificación humana, lo que conllevó a una revolución en el campo genético mismo que se sujeta en innumerables y valiosas herramientas tales como los: "STR (Cortas repeticiones en Tandem), VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tandem) y PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)", de amplia utilidad en la identificación humana y la práctica forense.⁽⁹⁾

La tecnología del ADN recombinante en genética forense ha ganado un amplio beneficio en la identificación de crímenes violentos que presentan evidencia biológica, donde no solo permite determinar la culpabilidad de un individuo como los casos de violaciones y homicidios, sino que también permiten excluir a posibles sospechosos.

Actualmente en Bolivia el IDIF "Instituto de Investigaciones Forenses" *Fiscalía General de la República La Paz - Bolivia* es la única institución Estatal legalmente avalada por el ente judicial que realiza la tipificación del ADN en el análisis de paternidad y genética forense. Infortunadamente esta Institución carece de estudios sobre

estadísticos poblacionales de marcadores genéticos comúnmente empleados para dichos fines lo que determina que aquellos casos que podrían ser fácilmente resueltos con el empleo del "ADN" tomen mucho tiempo en solucionarse o sean resueltos en otros países. ⁽³²⁾

La tipificación del ADN proporciona los medios para incluir o excluir a los individuos específicos comparados con la evidencia biológica, pudiéndose resolver casos de homicidios o agresiones sexuales, así como incluir o excluir una paternidad dudosa en casos de disputa de paternidad. Los resultados de la tipificación permiten unir la evidencia biológica encontrada en la escena del crimen con sospechosos específicos, también permiten la exoneración de personas que han sido acusadas falsamente. Por otro lado estas técnicas de ADN permiten la identificación de criminales lo que ayudara a la prevención de crímenes por reincidencia (Hechos criminales en serie).

La evidencia del ADN se ha admitido en numerosos casos delictivos y se ha demostrado su importancia en el análisis de evidencias. Es más, la validación de los resultados obtenidos mediante esta técnica nos lleva a dar conclusiones más rápidas y juiciosas, es decir la evidencia de ADN es objetiva y no se presta a subjetividades, de manera que pueden refutar o apoyar a otras evidencias que tengan cierto grado de duda.

El ADN emplea el análisis de varios *locus* "Posición constante de una secuencia genética en un cromosoma" del genoma humano que dan lugar a un patrón genético único "o casi único" para cada individuo. La mayoría de los *locus* hipervariables corresponden a los microsatélites de ADN, más específicamente STR (Secuencias Cortas Repetidas en Tándem) que son bloques de repeticiones tandémicas, es decir que estas repeticiones siguen un patrón cola - cabeza - cola lo que sugiere este tipo de ordenamiento. El número de repeticiones varía entre individuos no relacionados y por tanto el número de repeticiones de varios *locus* da lugar a un patrón único.

En la actualidad todos los países concientes de las ventajas que ofrece el empleo de la técnica de los análisis de tipificación del ADN en base a la amplificación de STR prefieren esta en relación a los análisis de restricción e hibridación, entre estas ventajas las principales son: requieren menor cantidad de muestra para un análisis exitoso y se puede emplear ADN de bajo peso molecular (degradado) como el obtenido en las muestras forenses, además de ser técnicas rápidas, confiables y económicas.

Los alelos en cada microsatélite cumplen las leyes de Mendel específicamente la ley de la dominancia y la segregación independiente dentro las cuales se revela que las unidades hereditarias no se mezclan entre sí, sino que permanecen inalterables en el transcurso de las sucesivas generaciones, por lo que pueden ser empleados en la identificación de un gen particular o para determinar las relaciones familiares.

Recientemente el XII simposio latinoamericano de identificación humana recomendó que los 9 *loci* STR: CSF1PO, FESFPS, Vwa, F13A01, TPOX, THO1, D7S820, D13S317 Y D16S539, sean incluidos en el set de *loci* usados para el análisis de STR; estos *loci* fueron seleccionados debido a poseer un elevado poder de discriminación en las poblaciones de esta región. El tamaño de los microsatélites STR amplificados varían de una persona a otra. ⁽⁴⁾

Al hablar de las pruebas de paternidad o la determinación de vínculos familiares debemos tener presente que los padres transmiten a la nueva generación el 50% de su material genético, por lo tanto la evaluación probabilística de los marcadores genéticos de ADN variaran en función del vinculo familiar. Entonces en el análisis de un caso de paternidad la mitad de las bandas del patrón genético del hijo coinciden con las de la madre y el resto debe provenir del padre. Si en el hijo se presentan bandas que no corresponden ni a la madre ni al supuesto padre se determina que este último no es el padre biológico con un 100% de seguridad, por otro lado si el

supuesto padre tiene las mismas bandas que el hijo que no se presentan en la madre, no puede ser excluido como padre biológico.

Mientras más STR coincidan entre el hijo y el supuesto padre mayor es la probabilidad que sea su padre biológico. Se analiza suficientes marcadores genéticos como para asegurar que un individuo es el padre biológico con una certeza mayor al 99.99%. Estos valores de probabilidad de encontrar a una persona con el mismo patrón genético y de certeza de identificación se expresan como: probabilidad de concordancia, poder de discriminación e índices estadísticos poblacionales que varían de población en población de acuerdo a la frecuencia en se presentan los alelos del marcador genético dado por la diversidad de mezcla genética. ⁽³⁶⁾

El mapeo total del genoma humano dio lugar a un sin fin de aplicaciones médicas, determinación de vínculos familiares, identificación de personas y otras como la investigación criminal, etc; teniendo aquí una multitud de fuentes de información que podrían llegar a vulnerar un derecho constitucional el del respeto a la dignidad y a la libertad de una persona tipificado en el Título primero, Art. 6, II de la constitución política del estado.

II. ANTECEDENTES

En orden cronológico, puede decirse que el inicio de investigación en el análisis de ADN se produce en abril de 1985, cuando el primer caso judicial es resuelto por aplicación de técnicas moleculares de caracterización de secuencias hipervariables en ADN (ácido desoxirribonucleico).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las Huellas Digitales Genéticas (HDG) o "ADN-Fingerprinting" permitieron aclarar una disputa por inmigración a Gran Bretaña. Poco tiempo después, una corte civil inglesa acepta la evidencia de ADN en un caso de paternidad discutida. ^(29, 30)

La promoción de esta prueba en la investigación criminal se produce en octubre de 1986, en un caso de homicidio en el que se comprobó la inocencia del principal sospechoso.

Recién a partir del año 1987, las pruebas de ADN son admitidas como evidencia en las Cortes Criminales de Gran Bretaña y de Estados Unidos. ^(35,36)

Estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), emplean iniciadores o *primers*, que son secuencias de ADN complementarias de las zonas flanqueantes de la zona de interés, que es amplificado por una ADN polimerasa durante ciclos térmicos adecuados lográndose millones de copias de la región.

En 2002, el U.S. Congress Office of Technology Assessment concluye que la identificación de individuos basada en las pruebas de ADN es científicamente válida, siempre que se disponga de la certeza metodológica de su realización. La estandarización de las mismas ha sido encarada, entre otros por los laboratorios del FBI. ⁽²¹⁾

2.1. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL ADN

Los ácidos nucleicos están formados por un azúcar (pentosa), bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y ácido fosfórico en el caso de ADN la pentosa es el desoxirribosa, y en el RNA tiene ribosa.

Las bases púricas son adenina y guanina tanto para el ADN como para el ARN, las bases pirimidínicas, para el ADN son citosina y timina y en el ARN cambia la timina por el uracilo.

Los nucleótidos son las unidades monoméricas de la macromolécula de ácido nucleico, que resultan de la unión covalente de un fosfato y una base heterocíclica con la pentosa. Dentro el nucleótido, la combinación de una base con la pentosa constituye un nucleosido en las células eucariotas el ADN esta asociado con histonas y constituye un complejo nucleoproteína llamado cromatina.

El ácido nucleico formado por diferentes nucleótidos alternados dentro de las cuatro variantes mencionadas y en forma lineal en una doble cadena helicoidal, codifica para la producción de proteínas o polipéptidos.

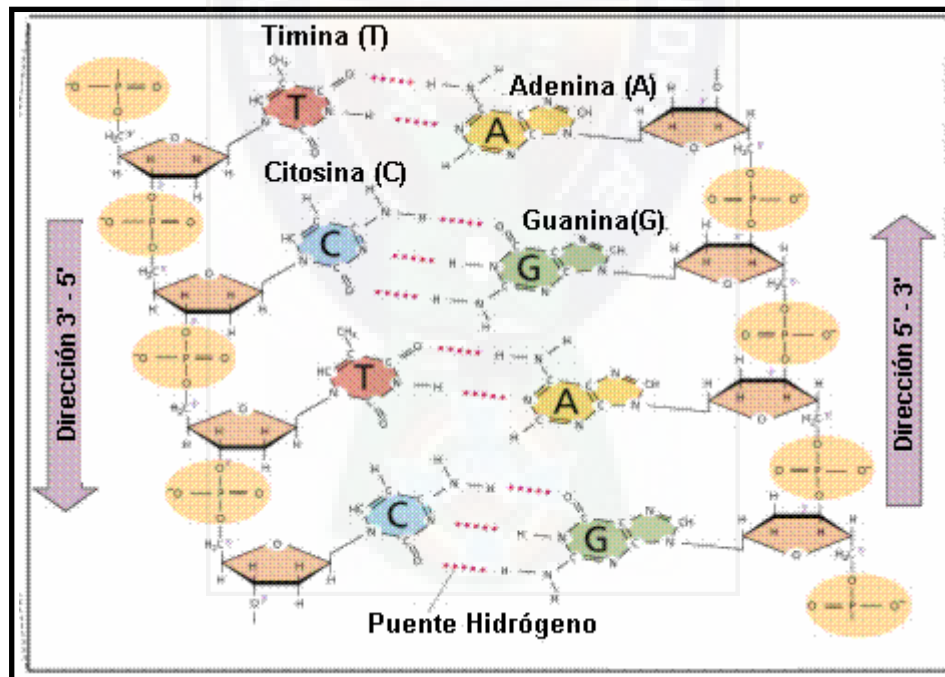
El ADN es el material genético que conforma el código de la herencia para determinar las características de los individuos, excepto en los gemelos Univitelinos. Cada individuo posee un código de ADN que es único y convenientemente analizado es capaz de diferenciar a un ser humano de entre todos los demás. ⁽²²⁾

Desde un punto de vista gráfico podríamos asemejar al ADN a una escalera retorcida en caracol, cuyos peldaños están compuestos por una materia que integran los genes. Cada gen marca las directrices para que se haga un carácter: así un gen haría un color de pelo, unoque fuese rubio, otro rizado, una enfermedad, predisposición, etc.

El genoma es el conjunto de material de un ser vivo. El soporte físico del genoma es el ADN contenido en los cromosomas. Dichos cromosomas a cada persona le son proporcionados la mitad de la dotación del padre y la otra mitad de la madre, pero cada padre y madre cada vez que procrean producen una persona con su dotación génica particular, única.

Cada célula del organismo contiene la dotación cromosómica (46 cromosomas impares) y por tanto el ADN típico de cada persona. Así si analizamos un pelo, esperma, trozo de piel, sangre, encontramos células con su ADN. (41, 24)

Figura1. Estructura y principales componentes del ADN (Ácido Desoxirribonucleico)



2.1.1. TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Los cromosomas se encuentran en las células somáticas, células de características diplóide, por lo que presentan 46 cromosomas en 23 pares de cromosomas ($2n = 46$). Los cromosomas que forman cada par son llamados homólogos, siendo estos constantes en cada especie. ⁽⁴⁰⁾

Cada gen ocupa un lugar definido en el cromosoma que es denominado *locus*. Los cromosomas homólogos que forman cada par presentan un mismo *locus*. ⁽³⁴⁾

Cuando en las células de un individuo los genes componen un par no idéntico entre sí, este individuo es denominado heterocigoto para un carácter determinado es decir que los genes están en heterocigosis. Cuando los genes o alelos son idénticos, el individuo es denominado homocigoto.

En la especie humana las células somáticas sufren un proceso de división llamado *mitosis* la cual originara otras dos células con 46 cromosomas. Siendo la mitosis un proceso importante en el crecimiento de organismos multicelulares y también en los procesos de regeneración de tejidos del cuerpo.

La mitosis es un tipo de división que da lugar a nuevas células. Una célula que presenta $2n = 46$ cromosomas, al sufrir el proceso de meiosis originará cuatro células con $n = 23$ cromosomas. Este tipo de división ocurre en el proceso de formación de los gametos teniendo una estrecha relación con las leyes de Mendel.

2.1.1.1. CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS

Los cromosomas son estructuras complejas localizadas en el núcleo de las células, compuestas por ADN, histonas y otras proteínas, RNA y polisacáridos. Son básicamente los "paquetes" que contienen el ADN.

Tomando en cuenta su morfología microscópicamente hablando los cromosomas se ven como estructuras delgadas y alargadas. Tienen un brazo corto y otro largo separados por un estrechamiento o constricción primaria llamada *centrómero*. El brazo corto se designa como *p* y el largo como *q*. El centrómero es el punto de unión del huso mitótico y es parte integral del cromosoma, es esencial para el movimiento y segregación normal del cromosoma durante la división celular. ⁽⁴⁶⁾

Los cromosomas *metafásicos* humanos presentan tres formas básicas y se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de los brazos, así como por la posición del centrómero, presentándose:

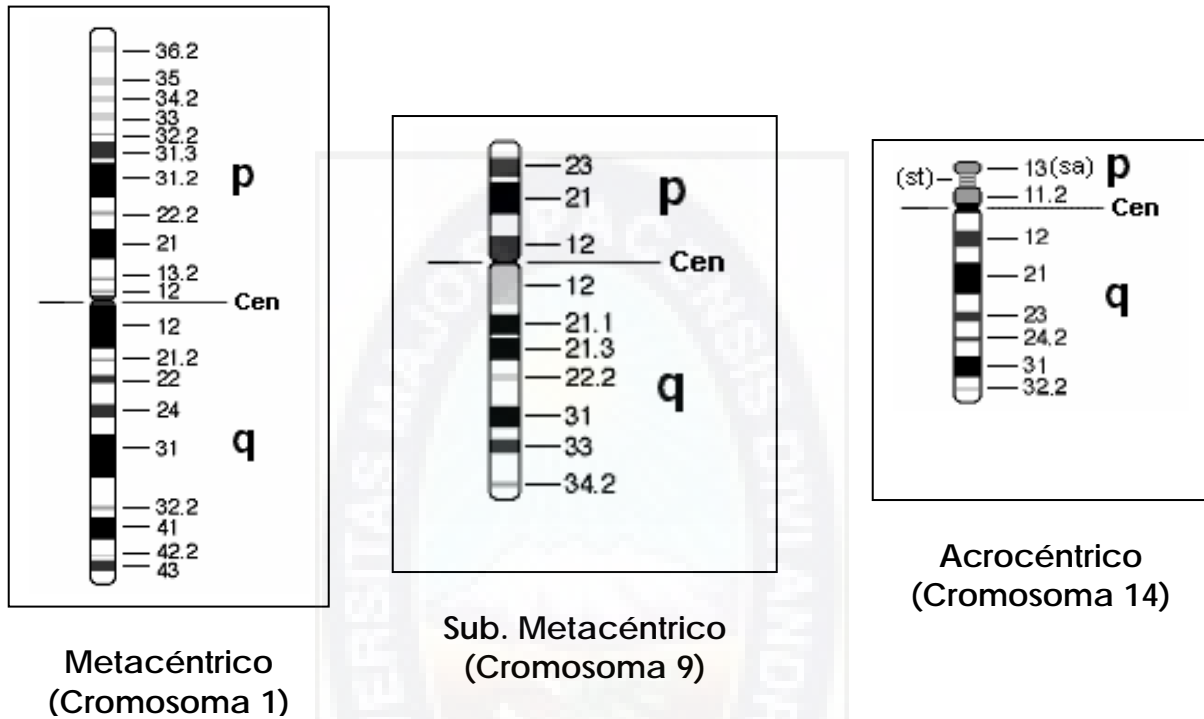
- ◆ *Metacéntricos* cuando tienen los brazos aproximadamente de la misma longitud, con el centrómero en el punto medio.
- ◆ *Submetacéntricos* cuando tienen los brazos de longitudes desiguales, con el centrómero más próximo a uno de los extremos.
- ◆ *Acrocéntricos* cuando tienen el centrómero muy cerca de un extremo, con un brazo corto muy pequeño.

Con frecuencia los cromosomas tienen constricciones secundarias en los brazos cortos, conectando trozos muy pequeños del ADN al centrómero.

Los ideogramas, de los cromosomas 1, 9 y 14 con bandas G son ejemplos típicos, respectivamente, de cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos.

El ideograma es básicamente un "mapa cromosómico" que muestra la relación entre el brazo corto y largo en relación al centrómero (*cen*) y en el caso de cromosomas acrocéntricos, los tallos (*st*, de *stalk*) y satélites (*sa*). ^(27, 3)

Figura 2. Representación gráfica de los Ideogramas de cromosomas Metacéntricos, Submetacéntrico y Acrocéntrico



2.2. ADN CODIFICANTE Y ADN NO CODIFICANTE

2.2.1. ADN CODIFICANTE

Los genes que contienen este ADN tienen la propiedad de codificar la fabricación de proteínas que actúan a nivel celular y que se expresan en la persona como un carácter individual y que puede ser normal o patológico. Soporta gran presión selectiva lo que se traduce en una variación limitada de estas regiones.⁽⁴⁰⁾

2.2.2. ADN NO CODIFICANTE

Es un ADN que no codifica proteínas por lo que se lo ha llamado ADN “chatarra o basura”, por desconocer a ciencia cierta su función.

Este ADN ha demostrado una gran utilidad a la medicina forense ya que permite la identificación humana, resolviendo así numerosos problemas médico – legales.

Cabe recalcar que la presencia de ADN repetitivo, también llamado ADN no codificante es propia de los eucariotas desde protozoarios hasta células superiores de animales y vegetales. Esto no pasa con los virus ni con las bacterias (organismos procariotas), donde la cantidad de ADN es mínima, pero cuya utilidad es máxima, denominándose ADN satélite, por que con frecuencia pueden separarse de la masa del ADN por centrifugación en cloruro de cesio.

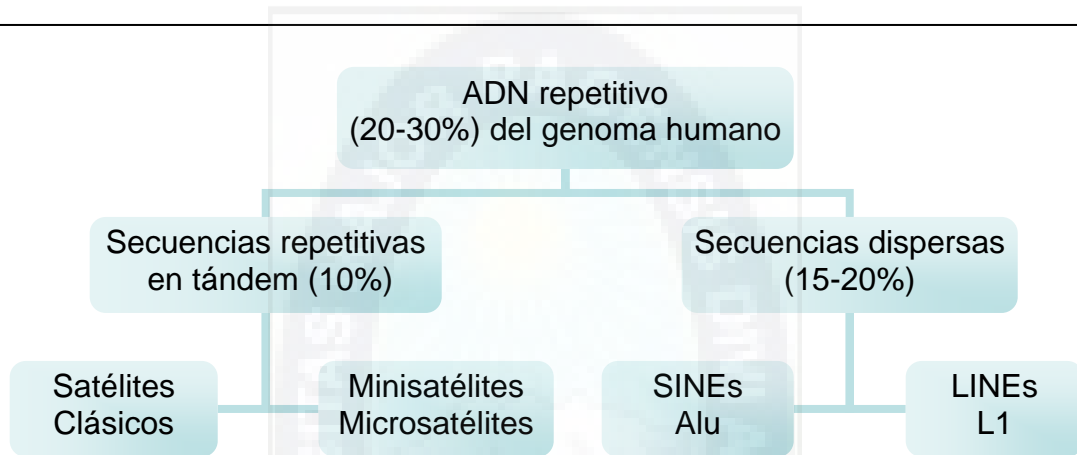
En la actualidad la función de esta parte del ADN es desconocida pero si se sabe que no guarda información genética y juega un importante papel en la estructura y función de los cromosomas, también actúa como puntos calientes en el *Crossing – over* (recombinación o intercambio de material genético, base de la herencia) durante la meiosis. ⁽⁵⁰⁾

Este ADN puede ser de dos tipos:

- **ADN de copia única.** Esta compuesto por secuencias que se encuentran representadas una o muy pocas veces en el genoma, se cree que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de ADN.
- **ADN de copia múltiple.** Las secuencias de este tipo de ADN, también denominado ADN repetitivo, pueden ser altamente repetitivas, moderadamente o poco repetitivas. Podemos clasificarlas en base a sus dos características mas importantes; su disposición a lo largo del genoma y el tamaño de la unidad de repetición
 - **ADN repetido en Tándem.** Se compone de un grupo de secuencias repetitivas agrupadas en tándem, según el tamaño de la unidad de repetición se subdivide en 3 tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite.

- **ADN Repetitivo Disperso.** Las unidades de repetición no se agrupan sino que aparecen dispersas a lo largo del genoma. Siendo representado por dos familias; SINEs Y LINEs. ^(38, 49)

Figura 3. Clasificación del ADN repetitivo en el Genoma Humano



2.3. POLIMORFISMO DEL ADN

El término polimorfismo fue empleado por Ford (1940) para designar “la aparición conjunta en un lugar de dos o más formas discontinuas de una especie de tal manera que la más rara de ellas no se puede mantener simplemente a través de la mutación periódica”. En la Práctica, para que un *locus* sea considerado polimórfico, el alelo más común para ese *locus* debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con la ley de *Hardí-Weinberg* al menos un 2% de la población debe ser heterocigota para ese *locus*. ⁽⁴⁰⁾

En el ADN codificante existe poca variabilidad individual exceptuando la región HLA, el margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. El ADN no codificante por el contrario, al no estar sujeto a presión selectiva intensa puede soportar generalmente grandes

niveles de variabilidad sin que se produzca repercusión fenotípica. Esta característica ha convertido a este tipo de ADN en la mayor fuente de investigación de polimorfismos en Genética Forense. (6)

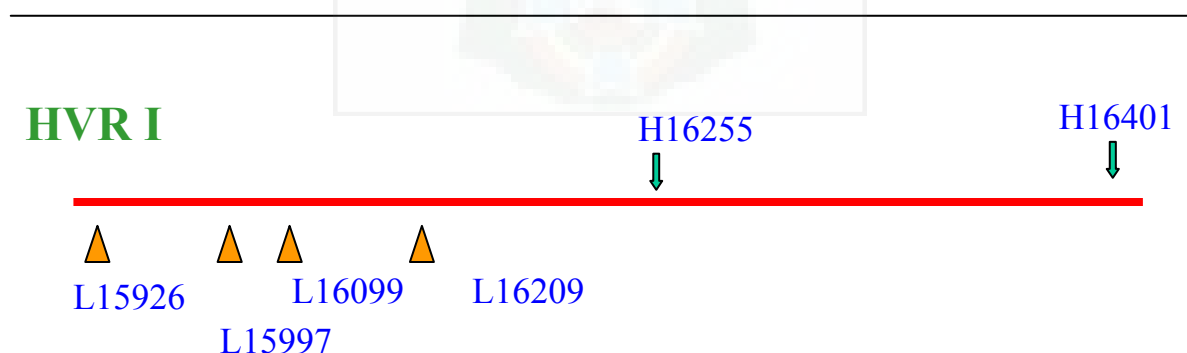
Los Polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición dependiendo netamente de términos probabilísticos dependientes a su vez de inserciones o deleciones en una determinada secuencia.

2.3.1. POLIMORFISMOS DE SECUENCIA

Se producen por el cambio de uno (mutación puntual) o más nucleótidos en una secuencia de ADN, suelen ser poco polimórficos y son típicos de ADN expresivo.

Este tipo de polimorfismos presentan una elevada importancia en el estudio de la determinación del linaje materno en lo que respecta al análisis forense, es decir que puede ubicar este tipo de polimorfismo a nivel del genoma mitocondrial y más específicamente en las regiones HVR I y HVR II, mismas secuencias que son puntos blanco en el análisis de la matrilinea y su aplicación en el campo de la genética forense. (27)

Figura 4. Representación gráfica del polimorfismo de Secuencia del ADN mitocondrial.



2.3.2 POLIMORFISMO DE LONGITUD

Se producen por la inserción y deleción de uno o más nucleótidos este tipo es el más abundante en ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini y microsatélite.

Los *loci* minisatélites y microsatélites están formados por repeticiones en tándem de secuencias similares que varían en longitud, pudiéndose acompañar simultáneamente de polimorfismos de secuencia. La causa de variación se supone distinta en ambos casos, para minisatélites se atribuye a un mecanismo de conversión génica frecuentemente producidas por regiones de flanqueo. En el caso de los microsatélites la causa principal aparente se debe a un deslizamiento de unidades de repetición durante la replicación y que también la conversión génica muchas veces puede ser inducida por regiones de flanqueo pudiendo ser un mecanismo preferente de variabilidad. ⁽⁴²⁾

2.4. ADN REPETIDO EN TÁNDEM

Los distintos componentes de este tipo de ADN repetitivo adoptan un patrón de distribución cromosómica diferente; el ADN satélite se sitúa en la región centromérica, el ADN minisatélite en los telomeros o en sus proximidades y el ADN microsatélite aparece disperso por todo el cromosoma.

Las secuencias de ADN repetido en tándem se distribuyen en el genoma de dos maneras:

- ◆ **Tipo I.** Grandes bloques formados por repeticiones de distintas unidades de longitud variable, correspondiendo a los satélites clásicos I, IV y el satélite alfoide.

- ◆ *Tipo II.* Pequeños bloques distribuidos a lo largo de todo el genoma, con un número variable de unidades de repetición de secuencia similar. Pertenecen a este los tipos minisatélite y microsatélite. ⁽¹⁶⁾

Figura 5. Representación gráfica del ADN repetido en Tándem



2.4.1. ADN SATÉLITE

Las secuencias repetidas se disponen en grandes bloques de diversas unidades de complejidad variable, con una longitud desde 100 Kb a varios Mb. Este tipo de ADN no se transcribe y al organizarse de un modo tan complejo es difícil su aplicación en el campo forense.

Para separar el ADN satélite del resto del ADN genómico se somete a centrifugación en gradiente de densidad, Plata - Sulfato de Cesio, obteniéndose 2 bandas. La de menor densidad corresponde al ADN Satélite.

Se distinguen 4 tipos (I, II, III, IV) en función a su densidad, que esta en relación a la cantidad mayor o menor de su gradiente de concentración. Representan del 2 al 6 % del genoma y tienen una secuencia consenso (Unidad básica de repetición) de 5 a 170 pb.

Algunos satélites poseen una unidad de repetición de pequeño tamaño como los satélites II y III que consisten en la repetición de la secuencia ATTCC.

Existen otros tipos de ADN satélite que no pueden distinguirse por gradiente de densidad debido a que su densidad es similar a la de los satélites II y III. Se consiguieron caracterizar por digestión de ADN genómico mediante endonucleasas de restricción. El satélite alfoide pertenece a esta categoría, habiéndose comprobado que es el único satélite presente en todos los cromosomas, constituyendo la mayor parte de la heterocromatina del centromero. Su secuencia consenso contiene aproximadamente 171pb con variaciones individuales (Choo et al 1991) ⁽⁵⁰⁾

2.4.2. ADN MINISATÉLITE.

El término minisatélite se debe a Jeffreys, quien uso para designar *loci* de ADN repetitivo de un tamaño menor que el de los satélites clásicos (Jeffreys et al 1985 a). Los bloques de secuencias de este ADN poseen un tamaño aproximado entre 0,5 y 40 Kb y la unidad de repetición es de 10 -100 pb. Tienen un alto grado de Variabilidad tanto en el número de repeticiones en tándem como en la secuencia de unidad de repetición, por lo que a tamaños idénticos podemos estar frente a alelos diferentes.

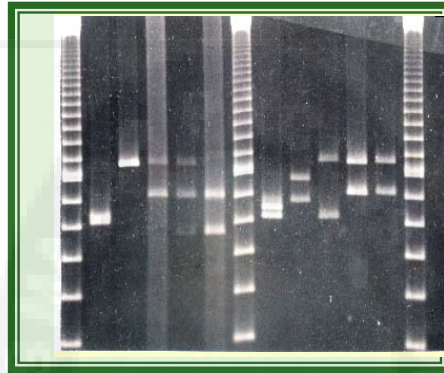
Posteriormente se denominaron a estos *loci* VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) aludiendo en la variación al número de unidades de repetición. ⁽⁴⁰⁾

Tomando en sentido estricto, este término podría aplicarse a cualquier tipo de ADN repetitivo y no exclusivamente al minisatélite y además, al hacer referencia solo al número de repeticiones, los minisatélites monomórficos humanos no podrían incluirse.

En el ser humano los minisatélites no se encuentran distribuidos al azar sino se localizan preferentemente en las regiones subterminales de cromosomas que son las

implicadas en los fenómenos de recombinación, sobre todo en la línea germinal masculina.

Figura 6. Corrida Electroforética del Minisatélite DS180



2.4.3. ADN MICROSATÉLITE

La utilización de este tipo de ADN representa una metodología de genotipaje diseñada para evitar los problemas de dominancia (falta de codominancia) y poca repetitividad (falta de consistencia). Estos fueron llamados así por su pequeño tamaño hasta unas 400pb lo que los hace ser idóneos para técnicas de PCR.

Así también los STR reciben el nombre de “Repeticiones Simples en Tándem”, “Repeticiones cortas en tándem” o “Short Séquense Repeats”, que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el genoma. Basándose en la longitud de la unidad de repetición y el número de veces que esta se repite junto con las posibles variaciones en su secuencia (Urquhart et al 1994) los clasifica en STR simples, compuestos y complejos. Posteriormente, Brinkmann (1996) propone una clasificación alternativa: STR con baja, intermedia y alta microvariabilidad.⁽⁴⁹⁾

Se trata de secuencias repetidas, pues la unidad de repetición oscila entre 2 y 7 pb repetidas en tándem, entre tres y cincuenta veces (típicamente no mas de 20 veces),

tomando en cuenta que son perfectas, es decir repeticiones idénticas o imperfectas no idénticas entre si. Generalmente se utilizan di-tri-tetranucleotidos con fines de identificación y mapeo, por ejemplo (CA) n o (GT) n. Es precisamente la variabilidad en el número “n” de repeticiones lo que crea el polimorfismo, de tal modo que disponiendo de una batería de unos pocos microsatélites que presenten suficiente grado de polimorfismo en la población, pueden realizarse identificaciones genéticas con una resolución muy elevada. ⁽²⁶⁾

2.5. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO.

Desde hace poco más de una década, la tecnología del ADN ha permitido el estudio de la variabilidad humana mediante el análisis directo del propio material genético y no a través del análisis de proteínas codificadas por este.

Wyman y White dieron el primer paso en la identificación genética por medio del ADN al descubrir un *locus* polimórfico caracterizado por un número de fragmentos de restricción de longitud variable, aunque el verdadero auge de los polimorfismos de ADN se inicia con *Jeffreys* y colaboradores quienes fueron sus introductores en el campo forense. ⁽⁵¹⁾

Los primeros en utilizarse con este fin fueron los denominados RFLPs “*Restriction ragment Length Polimorphism*” (*Jeffreys et al 1985*) polimorfismos en ADN minisatélite basados en la longitud de los fragmentos de restricción. Se identifican mediante la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción y posterior hibridación con sondas. Un problema legal de inmigración en el Reino Unido fue el primer caso resuelto satisfactoriamente con la ayuda de estos polimorfismos. ⁽²⁸⁾

En un primer momento utilizaron las sondas *multilocus* (*MLPs Multilocus Probes*), que detectan múltiples *loci* minisatélites bajo condiciones poco rigurosas de hibridación dando lugar a un complejo patrón de bandas. Este patrón de bandas múltiples

corresponde a distintos *loci* con secuencias relacionadas entre si. Jeffreys y su equipo consideraron que estos patrones serian prácticamente específicos para cada individuo y lo denominaron “huellas genéticas” (*ADN fingerprinting*).⁽²⁸⁾

Posteriormente se comienzan a utilizar sondas que permitan detectar un único *locus* que se denominan sondas *unilocus* (*SLPs, Single Locus Probes*) que proporcionan una o dos bandas según el carácter homocigoto o heterocigoto del individuo para este *locus*, de esta manera es que se obtiene un perfil *unilocus* de ADN.⁽⁴⁰⁾

Hoy en día solo las sondas *unilocus* debidamente caracterizadas están reconocidas para uso forense, han supuesto una evidente mejora metodológica en la investigación biológica de Paternidad pero existen importantes limitaciones para su uso en criminalística. Un método actual que ha revolucionado el campo forense es la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y más específicamente los STR.

Los *Ligth Cyclers* constituyen una nueva tecnología que nos permite llevar a cabo en una misma reacción la amplificación por PCR de un fragmento de ADN y la detección por fluorescencia en tiempo real. La hibridación con dos sondas independientes es de una gran especificidad y posibilita la cuantificación exacta del producto amplificado y la detección de posibles mutaciones.

Entre otros de gran importancia mencionamos a los *Chips o Arrays* de ADN mismos que son sistemas en miniatura que incorporan cientos de miles de sondas alelo específicas (*ASO Allele Specific Oligonucleotides*), si el fragmento de ADN diana marcado mediante la incorporación de un grupo fluorescente durante la PCR híbrida con la sonda complementaria, se detecta una señal de fluorescencia que es recogida a través de sistemas automatizados. Esta prometedora tecnología puede tener interesantes aplicaciones fundamentalmente: clínicas y forenses.

Por otro lado tenemos a la Espectrofotometría de masas, que nos permite el análisis de una muestra en cuestión de segundos, sin necesidad de emplear escaleras alélicas, pero de momento solo es utilizable en fragmentos de ADN menores de 100pb. Los productos al analizar se cristalizan conjuntamente con la pequeña matriz orgánica la cual luego de volatilizarse se somete a un campo eléctrico en fase gaseosa determinándose luego el peso molecular del ADN en función del tiempo empleado en llegar a un detector, ya que el tiempo es proporcional a la masa del fragmento de ADN. ⁽¹⁰⁾

La introducción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) vino a solucionar en gran medida muchas de estas dificultades por lo que ha supuesto un avance metodológico de enorme repercusión en genética forense, ya que nos permite trabajar con cantidades ínfimas de ADN aun estando degradado. Entre otras ventajas adicionales son la rapidez, sencillez y facilidad en la interpretación además de que esta requiere conocimiento previo de la secuencia (regiones adyacentes al microsatélite propiamente dicho) Es una técnica basada en PCR, tiene requerimientos bajos de mano de obra y costo, genera una elevada cantidad de información, presenta una genética de segregación codominante además de proporcionar una buena sensibilidad y especificidad por los argumentos anteriormente citados. ^(21, 28, 40)

III. MARCO TEÓRICO

3.1 STR CORTAS REPETICIONES EN TANDEM (*Short Tandem Repeats*)

Estas son secuencias pequeñas de ADN repetidas en tándem, constituidas por unidades de 2 a 7 pb que se repiten en un número variable de veces y que dan lugar a alelos de tamaño aproximado entre 80 y 400 pb, su gran utilidad se puso rápidamente en manifiesto debido a su abundancia, a su distribución regular por el genoma, naturaleza polimórfica y su pequeño tamaño que los hace idóneos para ser amplificados por PCR. Esta tecnología fue introducida en el campo forense a

principios de la década de lo noventa por *Edwards et al (1991)*, entre otros investigadores.⁽¹⁹⁾

De todos los polimorfismos analizables por PCR los de mayor interés médico legal, criminalístico y casos de filiación, pertenecen a los tipos minisatélite y sobre todo microsatélite. Ambos son particularmente adecuados por ser altamente polimórficos y presentar un alto grado de Heterozigosidad, puesto que estos polimorfismos se deben a diferencias en el número de copias de las unidades repetitivas que presentan los distintos alelos, pudiendo detectarse estos mediante la electroforesis en gel de Poliacrilamida como polimorfismos de longitud.

Estos polimorfismos pueden ser separados en clases discretas de alelos y clasificados por número de repeticiones, lo que no es posible con el empleo de sondas, de este modo se facilita enormemente la estima de frecuencias, constituyendo una ventaja desde el punto de vista estadístico.^(7. 26)

En la actualidad este polimorfismo puede determinarse mediante la técnica citada, misma que posee una elevada sensibilidad, así también la introducción de sistemas electroforéticos semiautomáticos y secuenciadores automáticos ha supuesto un gran avance en la automatización del análisis, facilitando su aplicación práctica.

Así también se debe destacar que el análisis no está sujeto a errores de medición en la migración de los fragmentos ni a fenómenos de distorsión del gel.

3.1.1 STR simples o de baja microvariación.

Están formados por dos o más unidades de repetición contigua e idéntica, tanto en longitud como en secuencia, la diferencia en tamaño entre distintos alelos es de una unidad de repetición, así como la presencia de alelos intermedios es excepcional. Se caracterizan por ser de fácil tipaje, pero tienen un principal inconveniente mismo que reside en su baja Heterozigosidad.

Entre los STR simples más usados están HUMTHO1 (*Edwards et al 1991*), HUMF13A01, HUMFES/FPS (*Polymeropoulos et al 1991*), que contienen una unidad de repetición tetranucleotídica y HUMCD4 cuya unidad es pentanucleotídica y que presenta importantes diferencias poblacionales. ⁽¹⁹⁾

3.1.2 STR compuestos de microvariación Intermedia.

Los sistemas comprenden dos o más unidades de repetición contiguas diferentes, que varían tanto en secuencia como en longitud. El de mayor interés forense es HUMvWA. ⁽⁴³⁾

3.1.3 STR Complejos de alta microvariación.

Pueden contener varios bloques de unidades de repetición con secuencias altamente variables e inconstantes. Son frecuentes los alelos intermedios y las sustituciones simples de bases en algunas unidades lo que ocasiona importantes variaciones tanto estructurales como de longitud produciéndose problemas de designación de alelos. Son los STR más difíciles de tipar y se acompañan también de una tasa de mutación más alta. Se están utilizando con buenos resultados sistemas muy polimórficos como HUMACTBP2 (SE33) (*Moos y Gallwitz 1983*), HUMD21S11 (*Sharma y Litt 1992*) y HUMFIBRA/FGA que presentan una alta tasa de Heterozigosidad. ⁽¹⁶⁾

Actualmente se están acumulando evidencias a favor de que inclusive los microsatélites más simples presentan algún grado de variabilidad interna en su estructura, por lo que la clasificación anterior sería cuestionable. Existen STR relativamente simples y extremadamente variables al mismo tiempo, como D12S391 y D1S1656 (*Lareu et al 1996, 1997*) en los que la asociación directa entre variabilidad y complejidad no es sostenible.

Las grandes ventajas de los STR son su estabilidad y posibilidad de realizar PCR multiplex amplificando varios *loci* simultáneamente (*Kimpton et al 1993*). Además su

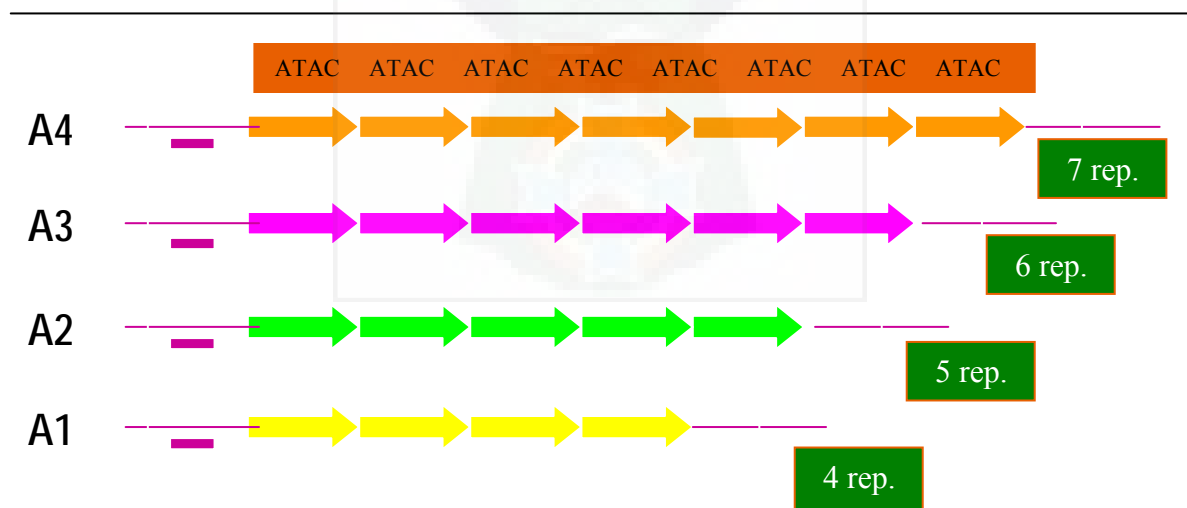
análisis se ha facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos de ADN (Ziegle et al 1992), sus aplicaciones son muy diversas, como construcción de mapas genéticos, estudios poblacionales, análisis de ligamiento en enfermedades genéticas, investigación del cáncer, estudios forenses, etc.

Los más abundantes y fáciles de amplificar son los que contienen 2 pb como unidad de repetición, pero ciertos problemas técnicos como la presencia de bandas “tartamudas por slippage” de la Polimerasa durante la amplificación hacen que se utilicen principalmente STR de repetición de 4 pb quienes son los más apropiados con fines forenses.

Cuando se trate de ADN altamente degradado, el tipaje de SLP e incluso AMPFLP suele ser negativo, mientras que la amplificación de STR proporciona generalmente resultados satisfactorios.

En los laboratorios forenses la tendencia actual viene marcada por la utilización de STR simples e hipervariables (Gill et al 1995) y multiplex de STR de pequeño tamaño ya que la degradación del ADN es inversamente proporcional al tamaño de los fragmentos (Alvarez et al 1996). ⁽¹⁾

Figura 7. Representación gráfica de los STR



En tal sentido y luego de valorar las virtudes y la aplicabilidad en el campo forense de los STR debemos no solo caracterizar a un STR sino a un marcador de un *loci* específico, para tal efecto debemos seguir una metodología apropiada con el fin de determinar el marcador adecuado para el estudio que se desee realizar.

Tabla 1. Características de Sistemas y marcadores de STR analizados en el presente estudio

GenePrint STR multiplex	Loci	Ladder Rango (pb)	STR Ladder N° de rep.	Otra posición N° de rep.	ADN K562 N° de rep.
<i>CTT Triplex</i>	CSF1PO	295 - 327	7,8,9,10,11,12,13,14,15	6	10,9
	TH01	179 - 203	5, 6, 7,8,9,10,11	9.3	9.3 , 9.3
	TPOX	224 - 252	6,7,8,9,10,11,12,13	None	9, 8
<i>FFv Triplex</i>	F13AO1	283 - 331	4,5,6,7,8,9,11,12, 13,14,15,16	3.2 , 10.5	5, 4.6
	FESFPS	15q25-qter	HUMFESFPS Human c-fes/fps Proto-oncogen	AAAT ²	
	vWA	139 - 167	13,14,15,16,17,18,19, 20	11, 21	16, 16
<i>SILVER STR Triplex</i>	D16S539	264 - 304	5,8, 9,4, 10,11,12,13,14,15	None	12,11
	D7S820	215 - 247	6,7,8,9,10,11,12,13,14	None	11,9
	D13S317	165 - 197	7,8,9,10,11,12,13,14,15	None	8,8

3.2 ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS DEL ANÁLISIS DE MARCADORES POLIMÓRFICOS

Al presente las tecnologías moleculares basadas en la PCR han facilitado que muchos laboratorios puedan ser protagonistas en el mapeo genético y la identificación forense, incluso en países en vías de desarrollo.

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica desarrollada en 1989 por *Kary B. Mullis*, la cual se fundamenta en la amplificación selectiva in vitro de secuencias de ADN, utilizándose un par de oligonucleótidos sintéticos de unos 15-25 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere

amplificar para su análisis. Estos oligonucleótidos son también conocidos como “iniciadores ó primers”, quienes actúan como cebadores en la síntesis de ADN, la cual está catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa; dicha enzima se aísla de una bacteria termófila capaz de mantenerse a temperaturas elevadas (79-85°C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por seg. ⁽³⁸⁾

La técnica consiste básicamente en ciclos sucesivos de desnaturalización del ADN anillado de oligonucleótidos y extensión por parte de la enzima Taq polimerasa, de manera que al final de cada ciclo de PCR se duplique la cantidad de moléculas clonadas. Concluido aproximadamente 25-30 ciclos la cantidad de ADN amplificado supera el millar de copias a partir de una molécula inicial.

La PCR permite analizar ADN degradado y en cantidades muy pequeñas por lo que aún minúsculas muestras de material biológico aportan evidencias de identidad. Estas ventajas han hecho que esta técnica se haya convertido en uno de los métodos de elección en la identificación genética de vestigios biológicos, así como en la investigación biológica de la paternidad.

Hoy por hoy los laboratorios de Genética Forense emplean la PCR multiplex bajo formato manual (empleando tinción argéntica) o automatizado en su mayoría (marcaje fluorescente) a fin de caracterizar simultáneamente diversos marcadores polimórficos y establecer los perfiles genéticos correspondientes a las diferentes muestras derivadas de la investigación criminal y/o vínculos biológicos. ⁽³⁹⁾

Las técnicas de análisis genético se encuentran en continuo desarrollo y evolución. La necesidad de técnicas que permitan el aislamiento y análisis de los casi treinta mil genes que componen el genoma humano justifica la existencia de líneas de investigación destinadas al descubrimiento de nuevos métodos que permitan

monitorizar elevados volúmenes de información genética en paralelo y que reduzcan tanto el tiempo empleado como el costo por análisis.

Desde el análisis de los primeros polimorfismos de ADN con fines de establecer la identidad humana, la Genética Forense ha sufrido una gran evolución. Es probable que la próxima revolución la constituyan los llamados biochips o microarrays que surgen como consecuencia de una combinación entre técnicas microelectrónicas empleadas para la fabricación de microprocesadores informáticos y materiales biológicos.

En general puede decirse que la principal característica de los chips es su capacidad para generar información en muy poco espacio posibilitando el procesamiento de una multitud de ensayos simultáneamente. Esta característica es la que hace que los biochips sean probablemente la tecnología del futuro en el campo de las investigaciones biomédicas y las ciencias forenses.

3.2.1 CONDICIONES DE UN BUEN MARCADOR POLIMÓRFICO

Los marcadores a seleccionar para hacer las experticias deben tener aceptación universal y deben estar debidamente validados para unificar los criterios de los laboratorios que los emplean.

Al presente la preferencia del tipo de marcador polimórfico utilizado recae en los STR empleados por todos los laboratorios para realizar las experticias de ADN, por tratarse de secuencias que están ampliamente distribuidas en todo el genoma. Estos pueden adquirirse a través de Kits comercialmente disponibles que se pueden analizar en sistemas mono y multiplex. ⁽⁴⁵⁾

Los microsatélites o STR han resultado ser de mucha utilidad para resolver casos de paternidad dudosa y de identidad. La tendencia en el ámbito mundial es la de utilizar repeticiones tri y tetranucleotídicas, muchas de las cuales tienen alelos pequeños fáciles de resolver aún en geles manuales. Además, se ha visto que estas son más

estables durante el proceso de amplificación y tienen una tasa de mutación más baja durante la replicación que las repeticiones dinucleotídicas. ⁽⁴⁵⁾

A continuación se especifican otras condiciones que deben tomarse en cuenta en un marcador polimórfico para ser considerado ventajoso en Genética Forense:

- ◆ Los genotipos correspondientes deben poder ser reproducidos con claridad y ser demostrables con técnica confiable y rápida mediante equipos y reactivos asequibles y a un costo razonable.
- ◆ Los genotipos deben permanecer constantes durante toda la vida y no ser susceptibles de alteración en ciertos estados patológicos y fisiológicos del individuo.
- ◆ Las formas de herencia deben ajustarse a los principios mendelianos simples, con una muy baja tasa de mutación y con pocas excepciones a las reglas de herencia.
- ◆ Los *loci*, es decir, los sitios que ocupan en los cromosomas los sistemas marcadores deben estar en cromosomas diferentes, de tal manera que se segregue independientemente, salvo los sistemas complejos como el HLA grupo de (antígenos de los leucocitos humanos), el Rh-Hr, el MNSs y otros que forman haplotipos. ⁽⁶⁾

Tabla 2. Localización cromosómica, secuencias repetitivas de los STR Multiplex

STR Locus	Localización Cromosómica	Definición del Locus	Secuencia Repetitiva
CSF1PO	5q33.3-34	HUMCSF1PO Human c-fms proto-oncogene For CSF - 1 receptor gene	AGAT ²
D16S539	16q24-qter	NA	AGAT ²
D7S820	7q11.21-22	NA	AGAT ²
D13S317	13q22-q31	NA	AGAT ²
F13AO1	6p24.3-p25.1	HUMF13AO1 Human coagulation factor XIII A subunit gene	AAAG ²
FESFPS	15q25-qter	HUMFESFPS Human c-fes/fps Proto-oncogen	AAAT ²
TH01	11p15.5	HUMTH01 Human tyrosine Hidroxilase gene	AATG ²
TPOX	2p25.1-pter	HUMTPOX Human Thiroid Peroxidase gene	AATG ²
vWA	12p 12 pter	HUMvWA Human von Willebrand Factor gene	AGAT ²

3.3 EL ADN EN LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS

La revolución en la genética forense tiene su origen en el descubrimiento de polimorfismos hipervariables en el ADN y la posibilidad de emplearlos en la identificación humana lograda por *Jeffreys* (1985), debido a que los rangos de probabilidad de inclusión se incrementan enormemente a más de 99.99% superando incluso la aplicación de todos los sistemas anteriores en conjunto.⁽²⁷⁾

La razón fundamental de la amplia difusión de estas técnicas estriba en el hecho de que mientras la serología clásica y los marcadores genéticos evaluables fenotípicamente presentan un número muy limitado de genotipos posibles, el continuo descubrimiento de las nuevas regiones hipervariables en el ADN resuelve el problema de la identificación certera de individuos y del establecimiento de vínculos biológicos de parentesco.

En los primeros trabajos con utilización de las técnicas de PCR si bien resultaba posible evaluar regiones de una muestra de ADN que podía estar muy degradada, la escasa variabilidad entre los individuos componentes de la población en general conspiraba contra la certeza incriminatoria del análisis; era factible que una evidencia coincidiera con un sospechoso al azar y mucho mas aún que a un padre alegado le fuera atribuida erróneamente la paternidad biológica de un descendiente putativo.

A partir de los años 90 la posibilidad de evaluar un gran número de sitios variables localizados en diferentes zonas del genoma, permitió analizar aunque fuera parcialmente muestras de tejido humano quemado y en estado de putrefacción, como el derivado del atentado a la embajada de Israel⁽¹⁹⁾

Posteriormente la incorporación de un número mayor de sistemas hizo posible el establecimiento de vínculos biológicos a través de secuencias de ADN de muy pequeño tamaño, con lo cual se logro la identificación de cadáveres momificados con reducción ósea total o quemados.⁽⁴³⁾

3.4 EL ADN EN LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL

Como es sabido la ciencia siempre avanza más de prisa que el derecho, ésta distancia existente entre uno y otro es fuente de conflictos entre ambos. Por una parte desde el punto de vista legal no se entienden muchas de las reticencias que se ponen a los planteamientos científicos y a las propias técnicas utilizadas, el resultado se ve como algo indiscutible desde posiciones diferentes a la propia ciencia; por su parte el derecho habla del “interés de la ciencia” en uno u otro sentido, como si ella fuera parte del proceso o de la imposición que hace al arrojar determinados resultados incontrovertibles.

Los problemas ético-legales que se pueden presentar en la investigación criminal por medio de los análisis de ADN están relacionados básicamente con: La negativa del consentimiento por parte del sospechoso a donar una muestra con la que se pueda comparar los resultados del análisis de indicio, y la puesta en marcha de bancos de datos genéticos para facilitar la investigación criminal. ^(10, 35,36)

3.5 DELITOS CONTRA LA LIBERTAD SEXUAL

El nuevo Código de Procedimiento Penal introduce el Sistema Penal Acusatorio y define los roles y funciones del Ministerio Público a quién se le ha otorgado la acción de justicia a través de la investigación del delito y la titularidad en el ejercicio de la acción penal pública, recurriendo a sus órganos auxiliares valiéndose los mismos de técnicas científicas de investigación criminal forense, específicamente en lo que amerita al caso la Prueba del ADN en la resolución de diversos casos criminalísticos en forma eficiente. ⁽¹¹⁾

3.5.1 AGRESIONES SEXUALES

La agresión sexual es un acto en el que una o varias personas empleando la violencia física o intimidación tuvieron acceso carnal con una persona de uno u otro sexo;

penetración anal o vaginal o introdujera objetos con fines libidinosos. El que bajo las mismas circunstancias del párrafo anterior, aunque no mediara violencia física o intimidación, aprovechando de la enfermedad mental, grave perturbación de la conciencia o grave insuficiencia de la inteligencia de la víctima, o que estuviera incapacitada por cualquier otra causa para resistir (art. 308 cod. Penal). ⁽¹³⁾

Este delito, es uno de los más frecuentes en nuestro país, en este tipo de delito como en otros se requiere información particular tanto de la víctima como del lugar del hecho y una colección de muestras muy estandarizada, a fin de llevar a cabo una investigación adecuada inclinada a dilucidar la responsabilidad criminal del sospechoso a través del análisis del ADN.

La víctima de la agresión sexual se constituye en la clave de la investigación criminalística, considerando que es una fuente de evidencias e indicios además del testimonio que nos pueda ofrecer, valga aclarar que antes de que la víctima sea una fuente de evidencias es un ser humano que tiene derechos a su intimidad y en un caso de violación el trauma psicológico es extremadamente delicado por lo que debemos cuidar de no victimizar por segunda vez a esta persona, considerando el estado en el que se encuentra.

La mayoría de los indicios que se encuentran en estos casos tienen una contaminación coetánea en mayor o menor grado, por lo que los restos de sangre, saliva, semen, encontrados sobre esta persona van a contener obviamente restos del portador. ^(11, 13,48)

3.5.2 COLECCIÓN DE INDICIOS EN EL CUERPO DE LA VICTIMA

La valoración dada por el médico forense orienta a la colección de los indicios siendo estos por lo general muestras de sangre, semen u otros fluidos biológicos como la saliva, evidencias que se deben recoger utilizando un hisopo estéril mojado en agua

destilada, presionando suavemente sobre la mancha, procedimiento que se sigue en todas las circunstancias pertinentes.⁽²¹⁾

En caso de tratarse de tomar una muestra de saliva en mordeduras (equimosis por succión o sugilación) de la misma manera que en el anterior caso limpiando en forma circular la marca dejada por los dientes y todo el área inferior que la delimita.

En algunos casos o casi siempre se procede a examinar las uñas de las víctimas en busca de indicios, inicialmente recogiendo los pelos o fibras que puedan existir y posteriormente cortar el borde superior de las uñas para analizar en el laboratorio la posible presencia de restos de sangre y piel.

Los pelos dubitados serán recolectados ya sea en forma particular o en grupo en un sobre de papel doblado con cuidado e introducido en una bolsa.

Todo este proceso de recojo de evidencias, inspección técnico ocular del lugar del hecho, procesamiento de las evidencias y presentación de estas en un juicio, requiere de un control riguroso administrativo técnico jurídico a fin de mantener la idoneidad de la prueba, para esto la justicia se apoya en la cadena de custodia.^(22, 32, 43)

3.6 CADENA DE CUSTODIA

Conceptualizamos el termino *Cadena de Custodia* como el conjunto de etapas o eslabones desarrollados en forma científica y legítima en una investigación judicial, misma que comprende el cuidado de las evidencias, pruebas o cualquier otro elemento encontrado en el lugar de los hechos, con el único objetivo de garantizar la integridad y originalidad de estas hasta que lleguen a su destino final.

Esta custodia se inicia en el lugar del hecho, en el momento en el que el investigador o el representante de la Policía Judicial se constituye en este lugar, por lo que se debe contar con dependencias apropiadas que permita la custodia de las evidencia impidiendo cualquier tipo de sustracción y una adecuada conservación. Para ello se

aplicara un documento en el que constará que toda persona sea cual sea su relación con el proceso investigativo se encuentre registrada en el mismo, pudiendo ser esta parte administrativa, técnica o jurídica y que haya tomado contacto con el equipo y/u objeto de investigación, desde el momento mismo de la información del hecho, siendo responsables cada una de estas personas según la etapa en la que se encuentre esta cadena.

Esta herramienta permite dar garantía científica a plenitud, cuidando que lo que se esta analizado en el laboratorio forense (o presentado en el juicio), es lo recabado (o decomisado) en el propio escenario del delito (o en otro lugar relacionado con el hecho), además de garantizar la autenticidad, preservación e integridad de los elementos de materia de prueba recolectados en virtud de una investigación, evitando la alteración (y/o destrucción) de los indicios materiales al momento o después de su recopilación o que los mismos puedan ser alterados, cambiados o perdidos.^(22, 53)

Las diferentes fases en las que puede intervenir la cadena de custodia parten como habíamos dicho desde el momento de la llegada al lugar del hecho siguiendo sistemáticamente a continuación, la inspección preliminar y búsqueda de indicios, seguidamente su participación en la fijación de la evidencia, recolección de los indicios, embalaje y empaquetado, el sellado y el etiquetado, transporte y entrega de la evidencia: y por último en el análisis pericial, siendo estos los pasos de actuación de la cadena de custodia.

En el Nuevo Código de Procedimiento Penal vigente en nuestro País, en los art. 186,295 y 297 se especifica lo referente a la cadena de custodia del material probatorio, como normas relacionadas en la construcción sistémica de la custodia de la evidencia.⁽²²⁾

Sumado a lo anterior, debe indicarse que dicha tarea de sistematización de normas y principios ha sido hasta el momento tomada a la ligera por el ente judicial, considerando que muchos de los casos quedan en la impunidad por la mala aplicación de estos, sin embargo un sector minoritario de la doctrina penal nacional sutilmente ha abordado el tema de la cadena de custodia con cierto grado de responsabilidad dentro del sistema procesal que nos rige, pero desde otra perspectiva como lo es el tema de la reserva probatoria. Este vacío doctrinario se trasluce en la práctica con la malogración o alteración de una buena cantidad de indicios materiales porque son erróneamente manipulados en la investigación judicial, lesionándose garantías procesales propias de un Estado constitucional de derecho como el nuestro y en perjuicio de un proceso penal que pretende la averiguación de la verdad real de los hechos en forma transparente.

3.7 ANÁLISIS LEGAL DE LA PRUEBA GENÉTICA EN BOLIVIA

3.7.1 MARCO JURÍDICO DE LA PRUEBA DEL ADN EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

EL análisis jurídico - técnico científico de la prueba del ADN como un medio probatorio nace con el único fin de dar solución a muchos de los principales problemas, tales como los de filiación, criminalidad, así como la investigación de la paternidad donde los métodos convencionales estipulados en los diferentes códigos (Civil, Penal, Familia, Niño Niña Adolescente) tienen un solo objetivo el de brindar un respaldo legal a la hora de ofrecer justicia, cabe hacer notar que sus alcances se resumían a casos sin resolver, insuficientes, e incluso negligentes a la hora de ofrecer el dictamen final.

El hecho llevaba a serias complicaciones por exponer una decisión de mucha importancia a circunstancias subjetivas de los supuestos testigos del hecho, complicándose la solución de los conflictos entre partes, así mismo el número de testigos no es un elemento contundente a la hora de presumir la responsabilidad tan

grande como por ejemplo el de la paternidad, por tener un nivel de confiabilidad, escasamente objetivo. ⁽¹¹⁾

Según el ART. 209 del Código de Familia la paternidad se excluye por todos los medios de prueba y especialmente cuando se demuestra:

- Que quién se señala como padre estaba durante el período de la concepción en imposibilidad física de cohabitar, por causa de alejamiento o ausencia.
- Que el señalado como padre se encontraba en el periodo de la concepción inhabilitado para procrear por enfermedad u otra causa semejante acreditada por un informe o certificado médico - científico.
- Que aún teniendo el indicado como padre la posibilidad de procrear, o habiendo cohabitado con la madre en el tiempo de la concepción, resulta de un examen o procedimiento médico científico que no puede ser el padre del hijo.

Siguiendo la secuencia para determinar la exclusión de la paternidad, exclusivamente en el tercer párrafo “examen o procedimiento médico científico” valiéndose muchos de este acápite exteriorizaron el análisis testifical y se valieron de herramientas científicas como la del ADN en la identificación de individuos, y más propiamente dicho en la identificación de paternidad. Por lo que muchos abogados valiéndose de este artículo dan curso a la investigación de la paternidad dudosa del imputado. Es en esa circunstancia que el ADN puede encausar un litigio, pues no se trata de un tema exclusivo de paternidad sino que es una prueba que puede ser utilizada de acuerdo a las necesidades que se vean en diferentes casos, demostrando la veracidad de un hecho. ⁽¹¹⁾

3.7.2 ANÁLISIS DE LA LEGISLACION VIGENTE EN BOLIVIA.

La legislación actual esta regida bajo el marco de la Constitución Política del Estado, porque en su Parte I, Titulo I se establece en su *art.* 6 que “todo ser humano tiene personalidad y capacidad jurídica con arreglo a las leyes. Goza de los derechos y

libertades y garantías reconocidas por esta Constitución “, así mismo se dice que “ la dignidad y la libertad de la persona son inviolables”, ratificando el derecho de todo individuo a tener los mismos derechos que los demás .

En lo que se refiere al Código Penal en su Título VIII, tipifica los delitos contra la vida y la integridad corporal, en su Art. 251 al homicidio u asesinato y otros delitos que se encuentran enmarcados en el ámbito criminal. Así también cabe mencionar al aborto, el estupro, violaciones abuso deshonesto, en si, todos estos delitos se encuentran caracterizados y penados por ley, pero muchos de estos en su mayoría quedan impunes ante una acusación debido a la falta de pruebas o a la poca contundencia de las mismas en la identificación del criminal.

Así mismo el Código de Familia en lo que refiere a la actualidad, se puede encontrar que con relación a la determinación del parentesco en su Capítulo II Art. 10 se establece que “La línea directa pueda ser paterna o materna según se determine el parentesco por parte del padre o de la madre” pero es más importante lo que se menciona en el Libro segundo cuando hace referencia a la filiación y los derechos fundamentales de los hijos, el Art. 174 nos dice “ Los hijos tienen los derechos fundamentales siguientes: A establecer su filiación paterna y materna y de llevar el apellido de sus progenitores, a ser mantenidos y educados por sus padres durante la minoridad y a heredar a sus padres”, por lo tanto queda muy claro que los hijos tienen todo el derecho de ser reconocidos por sus verdaderos padres para fungir como ciudadanos. ⁽⁴¹⁾

3.7.2.1 PRINCIPALES PROBLEMAS DE FILIACIÓN

En nuestros días y en nuestro País, la galopante proliferación de la promiscuidad en los barrios marginales, la inexperiencia, la falta de formación, instrucción o educación, hacen de la mujer víctima de su indefensión, existiendo así gran

porcentaje de madres abandonadas por el concubino o amante; empleadas domésticas embarazadas por el patrón o empleador, así también las víctimas de delitos de violación, abandono de mujer embarazada, etc.

Estos actos de libertinaje tienen el mismo resultado, donde el hijo nacido de éstas relaciones, generalmente son poseedores de los problemas de filiación; extremo que es consolidado por la miseria que impone sus condiciones para impedir la reclamación ante las autoridades pertinentes, ocasionando traumas o taras en los infantes.

He aquí, el fenómeno social existente en nuestros días, donde el estado debe poner su máximo esfuerzo y poner en práctica los postulados referidos en la ley, con el objeto de hacer imperativo el establecimiento de la filiación.⁽⁸⁾

◆ **Problemas de filiación citados en el código de familia.**

La codificación familiar entre los problemas de filiación, cita el conflicto de paternidad; negación del hijo nacido antes de los 180 días del matrimonio; negación del hijo en caso de demanda de divorcio o de separación; desconocimiento de paternidad; hijo nacido después de los 300 días de la disolución o anulación del matrimonio o de la ausencia del marido; acción de reclamación de filiación; reclamación e impugnación de filiación en caso de suposición de parto o de sustitución de hijo.

La Constitución Política del Estado, en su artículo 195 2da parte, prevé ya los problemas de filiación al referir que ésta debe establecerse por todos los medios, sin privilegiar ni menospreciar los que se presenten dentro o fuera del matrimonio.

◆ **Acción de reclamación de filiación.**

El artículo 191, enseña que la acción para reclamar la filiación del hijo de padre y madre casados entre sí, dura toda la vida del hijo.

Al parecer estaríamos entrando dentro de un círculo vicioso porque los artículos 178 y 179 del código de familia, los que previenen que el hijo concebido dentro de matrimonio tiene por padre al marido de la madre. Empero deja entrever las lagunas que se podrían presentar por ejemplo: a) cuando por negligencia el hijo no haya sido inscrito en el registro y los padres hayan fallecido; b) que el hijo haya sido concebido antes del matrimonio celebrado entre los padres y no fue reconocido etc. etc.

El derecho reconocido al hijo para reclamar su filiación dura toda su vida, sin embargo no ocurre lo mismo con los herederos de éste, quienes deben someterse a las reglas de la caducidad y prescripción.

◆ **Conformidad de la partida del registro y de la posesión de estado.**

Nadie puede reclamar una filiación distinta cuando hay conformidad entre la partida del registro y la posesión de estado. En forma simple y categórica sostiene el artículo 192 del código de familia.

Ante la inminente aparición de rasgos morfológicos entre un individuo y otro que no es precisamente el marido de la madre, surge el derecho de la duda, más aún si afloran hechos desconocidos para el hijo, que haga convencer a éste que el marido de la madre de quien lleva su apellido que consecuentemente ha adquirido esa posesión de estado no es su padre verdadero.

◆ **Reclamación é impugnación de filiación en caso de suposición de parto o de sustitución de hijo.**

La presente ley indica que en caso de suposición de parto o sustitución del hijo, éste puede reclamar una filiación distinta dando la prueba aunque haya la conformidad expresa tanto la partida del registro como la posesión de estado, facultando incluso a terceros interesados para intentar la acción de impugnación.

Para que exista suposición de parto, tiene que existir un hijo no parido por la supuesta madre y apropiado por ésta quién por una serie de actos de simulación pretende hacer ver que estuvo embarazada y que el hijo ajeno llegaría ser su hijo, cometiéndose de todos modos el delito de falsedad.

Para que exista sustitución de hijo debe demostrarse mediante prueba pericial científica, la paternidad biológica; la autoría de la sustitución, la identificación del individuo con quién fue sustituido o la indicación de éste, siendo la más importante la prueba pericial científica que determinará si es o no hijo del marido o del que se pretende reclamar como padre.

3.7.2.2 MEDIOS PROBATORIOS DE FILIACION

A partir de la segunda sección, del título segundo que compone el libro segundo; el código de familia señala las diferentes formas de probar la filiación, bajo diferentes circunstancias que nos permitimos detallar de la siguiente forma:

♦ Partida de matrimonio de los padres y de nacimiento del hijo.

La filiación del hijo de padre y madre casados entre sí, se prueba con los certificados o testimonios de las partidas de matrimonio de los padres y de nacimiento del hijo, constantes en el registro.

De ésta manera el código refiere que cuándo los padres son casados entre sí, basta la presentación de los documentos que menciona. Las certificaciones que emanen del registro constituyen fé o fuerza probatoria, referente al protocolo de la partida con preferencia a cualquier otro documento, así lo ordena el artículo 1.534 del código civil.

◆ **Posesión de estado.**

En defecto de la partida de nacimiento –dice el artículo 182– basta la posesión continua del estado de hijo nacido del matrimonio de los padres.

La posesión de estado, para este efecto, –dice– resulta el un conjunto de hechos que concurren a demostrar la relación de filiación y parentesco de una persona con los que se señalan como progenitores y la familia a la que se pretende pertenecer. En todo caso –agrega– que deben concurrir los siguientes:

1. Que la persona haya usado el apellido del que se señala como padre y en su caso, de la que se indica como madre.
2. Que el padre y la madre le hayan dispensado el trato de hijo, proveyendo en esa calidad a su mantenimiento y educación.
3. Que haya sido constantemente considerado como tal en las relaciones sociales.
4. Que haya sido reconocida la familia en esa calidad.

◆ **Otros medios de prueba; limitación a la prueba de testigos.**

Cuando faltan la partida de nacimiento y la posesión de estado, instruye el artículo 183, o cuando el hijo ha sido inscrito como de padres desconocidos o con nombres falsos, la prueba de filiación puede hacerse en proceso ordinario por medio de testigos. Esta prueba –agrega– sólo se admite cuando hay principio de prueba por escrito o cuando las presunciones o indicios resultantes de los hechos demostrados por otros elementos son suficientemente graves para determinar su aceptación.

El principio de prueba por escrito resulta –dice– de los documentos de familia, de los registros y de los papeles domésticos del padre y de la madre, de los actos públicos y

privados provenientes de una de las partes empeñadas en el litigio o de otra persona que si estuviese viva, tendría interés en él.

Para desvirtuar la imputación el artículo 184 refiere que la prueba contraria puede hacerse por todos los medios que sean aptos para demostrar que el reclamante no es hijo de la mujer que señala como madre o bien que no es hijo del marido de la madre si resulta probada la maternidad.

Para demostrar ambas peticiones, no es necesario condicionar la prueba testifical a la existencia de principio de prueba por escrito, sino tan bullado asunto sólo se puede determinar científicamente mediante el método más exacto que son las impresiones digitales del ADN.

♦ **Declaración judicial de paternidad y maternidad.**

Si no hay reconocimiento ni posesión de estado puede demandarse el establecimiento de la filiación por declaración judicial.

La acción sólo procede en vida del pretendido padre y corresponde al hijo o a quién lo represente y sus herederos, conforme a las previsiones del artículo 191, pudiendo también intervenir el organismo administrativo protector de menores. Sin embargo, el hijo póstumo o el que por ignorancia, engaño o por causa de fuerza mayor no hubiese reclamado oportunamente su filiación.

Ante la incertidumbre de paternidad o maternidad e inexistencia de prueba escrita, surge la majestuosa conquista social más importante de la legislación familiar en cuanto al establecimiento de la filiación, denominándose la acción de declaración de paternidad y maternidad. Esta es una verdadera joya ante las condiciones impuestas por la ley que tácitamente impiden el ejercicio de los derechos.

♦ Prueba de la paternidad.

En circunstancias de incertidumbre sobre la paternidad, el artículo 207; para salvar toda observación en un plano irresponsable refiere que la paternidad puede declararse con auxilio de todos los medios de prueba que sean idóneos para establecerla con certeza.

En el caso de la prueba testifical, serán necesarios –dice– cuatro testigos libres de tacha y excepción, y que sean uniformes, contestes y concluyentes en personas, hechos, tiempos y lugares.

Decíamos que peca de irresponsable, porque facilita la mala fé, el dolo y posteriormente el enriquecimiento ilícito, por cuanto el hecho de proponer cuatro testigos, puede hacer que una persona lleve la carga toda su vida de un hijo que no le pertenece en descendencia, careciendo con suma claridad de valor probatorio pleno. Siendo a todas luces necesaria la prueba científica pericial la que debe admitirse con certeza absoluta y más verosímil.

3.8 DESARROLLO DE LOS MÉTODOS DE INVESTIGACION BIOLÓGICA DE PATERNIDAD

Los primeros marcadores genéticos que se utilizaron como elementos forenses fueron los grupos sanguíneos del sistema ABO. Sin embargo, en diversas investigaciones se detectaban errores de tipificación y por lo tanto en los resultados del análisis de segregación en las genealogías, lo cual hizo pensar que los alelos A y B eran el producto de dos genes independientes. Tal cadena de fallas llevo a poner en dudas la validez de la prueba para la investigación de paternidad. Por fortuna en 1924 se demostró el error de la hipótesis mediante evidencias del alelismo del sistema ABO, también se probó que este sistema se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en la población.

A partir de este hecho, los grupos sanguíneos se utilizaron en las cortes europeas como evidencia de exclusión de paternidad. En la década de los treinta la prueba era empleada también en algunas cortes de los Estados Unidos. Sin embargo no es sino en 1940 cuando ambas cortes supremas (Europa y Estados Unidos) aceptaron oficialmente las pruebas con grupos sanguíneos como evidencia conclusiva de no culpabilidad de un asesinato o de no paternidad.

3.8.1 SISTEMA HLA (Antígenos leucocitarios humanos) COMO MÉTODO EN LA DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD.

Una vez desechados los métodos ya mencionados como técnicas para determinar la paternidad, se han incorporado un gran número de marcadores genéticos clásicos como son los grupos sanguíneos, proteínas plasmáticas, enzimas eritrocitarias y el complejo mayor de histocompatibilidad o antígeno leucocitario humano (HLA). De éstos los sistemas proteicos más comúnmente utilizados para la identificación de personas son el HLA y los grupos sanguíneos. Sin embargo, estos sistemas tienen poca variabilidad en la población, por lo que funcionan solo por exclusión y es necesario probar varios marcadores hasta que se encuentre la diferencia antigénica entre la evidencia biológica y el sospechoso. Cuando los antígenos del sospechoso concuerdan con los de la muestra problema, no se puede hacer el diagnóstico de identidad puesto que estos marcadores se encuentran en una proporción elevada de la población y pudieran concordar en ambas muestras solamente por azar. Otro problema en la utilización de estos marcadores proteicos es que no todos los tejidos del organismo contienen los mismos marcadores. Por ejemplo la determinación de los grupos sanguíneos sólo se puede explorar en muestras sanguíneas lo cual limita su utilización cuando hay que identificar cabellos, semen u otro tejido. Además las proteínas son poco estables y fácilmente se desnaturalizan con los cambios ambientales por lo que no son útiles para identificar muestras antiguas (días a años) o expuestas a condiciones ambientales muy agresivas.⁽⁶⁾

Actualmente, el estudio de marcadores polimórficos del ADN se ha convertido en una herramienta imprescindible en el análisis genético de vestigios biológicos de interés forense, implicando tantos casos de determinación de vínculos biológicos como de la investigación criminal.

El primer marcador de ADN humano altamente polimórfico fue descubierto por Wyman y White en 1980, los cuales al digerir el ADN con enzimas de restricción y usando una sonda de ADN arbitraria observaron en una pequeña muestra de individuos fragmentos de más de 15 longitudes diferentes que se heredaban de manera mendeliana.

Poco después, se encontraron otros marcadores hiper variables similares en la secuencia del gen de la insulina humana, en el oncogen "c-Ha-ras", en el pseudogen de la β -globina y en el gen de la mioglobina. En 1982, Bell y cols demostraron que estas regiones altamente polimórficas o *loci* hipervariables estaban compuestas de repeticiones en tandem de una secuencia de nucleótidos, y que su variabilidad dependía del número de dichas repeticiones. ⁽³²⁾

En 1985, Jeffreys llamó a estas regiones minisatélites o regiones hipervariables y posteriormente en 1987, Nakamura las denominó número variable de repeticiones en tandem o VNTR, por sus siglas en inglés. Jeffreys y colaboradores describieron un método de identificación individual que denominaron "ADN fingerprinting" o huella digital de ADN que consistía en la caracterización de regiones variables o polimórficas del material genético. Esto con la finalidad de producir el perfil del ADN específico para cada individuo. La aplicación por primera vez de este método en procesos penales se produjo en Inglaterra en octubre de 1986. Sin embargo, no fue sino hasta 1992 cuando se confirma de manera rotunda la validez de la prueba de ADN. ⁽²⁸⁾

La introducción de los polimorfismos de longitud a mediados de los años ochenta supuso una verdadera revolución en el campo de la Genética Forense. La posibilidad de realizar un análisis molecular de un número reducido de estas regiones hipervariables mediante el análisis de RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*, por sus siglas en inglés) permitió obtener por primera vez una información muy precisa acerca de la identidad genética del individuo del que proviene el vestigio biológico en estudio. Sin duda la ventaja principal de los marcadores VNTR que es consecuencia de su alto grado de polimorfismo, es su enorme poder de discriminación. ^(31,50)

El descubrimiento a principio de los años noventa de un gran número de regiones microsatélites o STR (*short tandem repeat*) en el genoma humano supuso un gran avance para la Genética Forense. Los marcadores de tipo STR son polimorfismos de 2 a 7 nucleótidos y debido a que el tamaño de los alelos de los STR es generalmente menor de 350 pb son susceptibles de ser analizados mediante técnicas de amplificación génica (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR) que ofrecen una gran sensibilidad, lo que ha permitido el análisis de este tipo de marcadores genéticos a partir de muestras con cantidades muy pequeñas de ADN e incluso cuando este ADN se encuentra en un estado avanzado de degradación.

Por otro lado y en contraposición con lo que ocurre con los sistemas VNTR, la determinación del tamaño de los alelos de marcadores STR se realiza con una gran precisión (resolución de una base) y además es posible realizar un análisis simultáneo de distintos STR mediante el procedimiento conocido como PCR multiplex. ⁽⁴²⁾

3.9 LA PRÁCTICA DE LA PRUEBA DE ADN EN BOLIVIA

La ejecución de estas pruebas se encuentra estratificada tanto en área pública como en las entidades privadas, sirva aclarar que el IDIF “Instituto de Investigaciones Forenses, Fiscalía General de la República La Paz - Bolivia” dependiente del Estado, es la única institución legalmente avalada por las instancias judiciales, sin dejar de

lado al sector privado teniendo en cuenta que estos podrían cumplir esta función siempre y cuando las circunstancias lo ameriten. Entre los principales laboratorios podemos citar: Gen y Vida, SELADIS “Laboratorio de Servicios de Diagnóstico de Investigación en Salud” y otras entidades que se encuentran en planes de ejecución.

Uno de los principales problemas en nuestro medio es el acceso a tecnología de punta debido al elevado costo que demanda esta, en este caso en particular el gobierno debería proponer políticas de protección a la familia con mayor interés, en coordinación con instituciones y organizaciones especializadas.

Concretamente la sangre es la muestra idónea para poder obtener un perfil genético, no siendo esta la única fuente para estos fines, por lo que la misma es de amplio interés en la materia penal “ violaciones, actos criminales, etc.” donde se requieren de pruebas contundentes que no lleven a subjetividades y ayuden así a determinar inequívocamente la inocencia o culpabilidad de uno o más individuos considerando que muchos de los administradores de justicia prefieren apelar a la conciencia de las personas y a la buena fé de las partes no gozando estas de credibilidad a la hora dar un dictamen, y es en este sentido que nos vemos en la necesidad de aportar con un granito de arena generando conocimiento técnico científico en esta área. ⁽²⁾

3.9.1 INSTITUCIONES OFICIALES ENCARGADAS DE LA PRUEBA DEL ADN EN BOLIVIA

En el país existe una institución oficial que se encuentra trabajando en este campo el “Instituto de Investigaciones Forenses”. Según el Nuevo Código de Procedimiento Penal “NCP” norma vigente en la jurisdicción boliviana promulgado por la ley 1970 el 25 de marzo de 1999, en sus artículos 69, 75 tipifica al Instituto de Investigaciones Forenses IDIF como el órgano de investigación primordial en el marco de la investigación criminal, institución que pese a su autonomía marcada depende o es parte del ministerio público quién la reconoce dentro el Título IV - Capítulo II, art. 80

de la Ley Orgánica del Ministerio Público designándola como el órgano encargado de realizar todos los estudios técnicos científicos requeridos para la investigación de los delitos por el ministerio público, o por las partes. Igualmente se encargara de los estudios técnicos científicos para la comprobación de otros hechos encomendados por orden judicial. (33, 41)

Las funciones a cumplir por el IDIF están estipuladas en el Título IV - Capítulo II art. 82 de la Ley Orgánica del Ministerio Público y tipifica lo siguiente:

1. Practicar los análisis y exámenes técnicos científicos de laboratorio y realizar las investigaciones forenses que sean solicitadas por el fiscal y/o encomendadas por orden judicial.
2. Desarrollar y elaborar programas científicos de investigación forense y criminalística aplicando los resultados de tales avances.
3. Editar y publicar las actividades, programas, e investigaciones científicas resultantes.
4. Coordinar programas de capacitación y de intercambio
5. en avances científico con organismos de investigación nacional e internacional.
6. Colaborar dentro y fuera de la república, con gobiernos, instituciones, autoridades y personas, en relación a la investigación criminal en coordinación con la administración del Ministerio Público.
7. Otras que le asigne la ley.

El hecho de contar con un órgano encargado de la realizar los estudios técnicos científicos requeridos para la investigación de los delitos ya es un avance en nuestra legislación ya que la tipificación del ADN se considera como un adelanto novedoso en nuestra justicia, lo lamentable es que el IDIF se limita a realizar los estudios periciales exclusivamente de los casos remitidos por el Ministerio Público dando preferencia a los casos de índole penal a pesar de que el IDIF cuenta con la

infraestructura, equipos y personal necesario para ejecutar pruebas de toda índole enmarcadas en el ámbito delictuoso.

Aún contando con este órgano investigativo se ve imposibilitada la ejecución de muchas de las pruebas, mismas que no se ejecutan debido a que en nuestro País no existen políticas que fomenten la investigación criminal e incluso nuestros administradores de justicia no reconocen el valor científico de esta prueba, considerándola simplemente como una prueba de referencia o en su defecto como una prueba de orientación. ⁽⁴¹⁾

3.10 ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS POBLACIONALES

3.10.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Desde un punto de vista estrictamente genético, puede decirse que una población se caracteriza por la distribución génica que esta posee. Una población mendeliana se define como un grupo de individuos que tienen en común el mismo cúmulo de genes y que están en condiciones de mezclarlos libremente al transmitirlos a la generación siguiente.

La Genética de Poblaciones estudia las consecuencias de las Leyes de Mendel a nivel poblacional. Los mecanismos hereditarios en que ésta se basa son los mismos descritos por Mendel pero generalizados a un grupo familiar o a individuos que habitan en una determinada población. Nos interesa conocer cuál es la proporción de la población que posee determinada característica, la frecuencia de cruces entre individuos con características específicas, los tipos y frecuencia de descendientes en estos cruces, como cambian las frecuencias alélicas o génicas de una generación a otra y que factores las modifican. ⁽³¹⁾

La especie humana, con cerca de 5.000 millones de miembros se divide en muchas subpoblaciones distinguibles fenotípicamente y que de forma tradicional se han denominado comúnmente **Razas**. Estas se definen como grupos poblacionales cuyos

acervos genéticos difieren entre sí. Sin embargo, estudios recientes en el campo de la antropología molecular han puesto en duda la existencia de tales “diferencias” entre las poblaciones, o mejor dicho la diferencia encontrada no ha sido tanta como la esperada, por lo que hoy en día el término *Raza*, se esta reconsiderando. Lo que si es evidente, es que las frecuencias alélicas en muchos *loci* varían ampliamente entre grupos poblacionales, incluso algunas de estas variantes se encuentran virtualmente restringidas a miembros de un solo grupo. La situación más frecuente es que distintos alelos tengan frecuencias diferentes en poblaciones distintas. Dentro de cada población existe mucha variación siendo ésta de mayor magnitud, por término medio, que las diferencias medias entre grupos.

Lo que le concierne a la Genética de Poblaciones es la distribución de los alelos dentro de ellas, así como los factores que mantienen o modifican estas frecuencias y por ende la estructura genética de una población dada, entre ellos podemos destacar: **las mutaciones**, como la base de las diferencias genéticas entre los seres humanos; **la selección**, ya sea a favor o en contra de un genotipo específico; **los entrecruzamientos**, íntimamente ligados a la selección; **el aislamiento de poblaciones**, muchas veces favorecidos por patrones de conductas sociales; **las migraciones**, como fenómeno demográfico que mezcla no solamente culturas sino que además fortalece el flujo génico entre poblaciones, y por último **la deriva génica**, que se relaciona con las variaciones al azar de las frecuencias génicas, predominante en poblaciones de tamaño pequeño. ^(21,47)

3.10.2 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE INTERÉS FORENSE

Dentro de la Genética Forense, se hace imprescindible manejar aspectos estadísticos que nos permitan valorar e interpretar de forma adecuada los resultados provenientes del análisis de una evidencia biológica.

La forma en que se reportan unos resultados y las bases teóricas que los apoyan, son de suma importancia para respaldar el fuerte valor que posee la Genética como herramienta en el campo forense.

Si dos muestras de cualquier tejido biológico tienen diferentes perfiles de ADN inmediatamente nos indica que pertenecen a dos personas diferentes; por otro lado, si los perfiles coinciden se plantean dos hipótesis probables:

- Primero, que las muestras pertenezcan a una misma persona o a un gemelo monocigoto.
- Segundo, que las muestras pertenezcan a dos personas diferentes pero que para las regiones de ADN estudiadas para elaborar el perfil genético, sean iguales.

Para conseguir respuesta a estas interrogantes, los genetistas forenses deben valerse de las estadísticas poblacionales con el objeto de estimar la fracción de personas dentro de la población que presenten este particular patrón genético.

De igual manera, al interpretar los perfiles genéticos aportados luego de un análisis de paternidad, debemos basarnos en la estadística para establecer la probabilidad de que un padre alegado sea el padre biológico o no del hijo en cuestión.

3.10.2.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS

Este es un parámetro fundamental de la Genética de Poblaciones para la aplicación de cualquier marcador genético en Genética Forense. El conocimiento de la distribución de los diferentes alelos de un sistema en una población de referencia constituye el primer paso de un largo proceso que culmina con la elaboración de un informe de paternidad o de criminalística.

La frecuencia de un alelo en una población se denomina frecuencia génica o alélica, y la podemos definir como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos.

Consideremos el caso de un *locus* con dos alelos; A y a. (la frecuencia del alelo **A** la llamaremos **p** y la frecuencia del alelo **a** será **q**. A partir de estos dos alelos solo hay tres genotipos posibles; AA, Aa y aa. Cuando no hay Dominancia y se pueden distinguir fenotípicamente los tres genotipos, la frecuencia genotípica vendrá dada por la proporción de individuos de un mismo genotipo, en relación al total de genotipos presentes en la población. ⁽³⁷⁾

Supongamos que tenemos **N** individuos en una población, en donde los del genotipo **AA** serán llamados **D**, llamaremos **H** a los de genotipo **Aa** y **R**, a los de genotipo **aa**. Lo que resultaría en:

$$D + H + R = N$$

Como todos los genotipos son distinguibles entre si, podemos establecer las frecuencias relativas de cada genotipo que vendrán dadas por:

$$D/N + H/N + R/N = 1$$

y también podríamos decir que:

$$d = D/N; h = H/N \text{ y } r = R/N$$

Entonces las frecuencias relativas de cada genotipo serían:

Tabla 3. Representación de genotipos posibles versus frecuencias de los mismos

Genotipo	Frecuencia
AA	d
Aa	h
aa	r
TOTAL	1

Para calcular las frecuencias alélicas en este caso, debemos considerar que cada persona tiene dos alelos en el *locus* en cuestión, por lo que los N individuos tienen $2N$ alelos. Al contar los alelos A en la población sumariamos dos alelos por cada individuo D y uno por cada individuo H . Así, la frecuencia relativa del alelo A (p) sería:

$$p = \frac{2D + H}{2N} = \frac{D + 1/2 H}{N} = d + 1/2 h$$

Análogamente la frecuencia de a (q) sería:

$$q = \frac{2R + H}{2N} = \frac{R + 1/2 H}{N} = r + 1/2 h$$

de donde tenemos que:

$$p + q = \left(\frac{D + 1/2 H}{N}\right) + \left(\frac{R + 1/2 H}{N}\right) = \frac{D + H + R}{N} = 1$$

Es decir que en un sistema genético de dos alelos, es posible obtener la frecuencia de uno a partir de la frecuencia del otro, puesto que:

$$p + q = 1$$

De esta manera podemos obtener la frecuencia alélica o génica en función de los genotipos observados en la presente generación.

Si tomamos el ejemplo del grupo sanguíneo MN, como es un sistema codominante, se pueden distinguir los fenotipos que serán equivalentes a los genotipos. La frecuencia de los alelos se puede determinar contando el número de cada clase de alelo que estén dentro de cada clase fenotípica.

Por ejemplo, en una población con 6129 individuos, la determinación del grupo sanguíneo arroja que hay 1787 homocigotos MM, 3037 heterocigotos MN y 1305 homocigotos NN. De los Homocigotos MM tendríamos 3574 alelos M (ya que cada uno de ellos lleva dos alelos M), de los heterocigotos MN se tendrán solo 3037 alelos M (porque M es la mitad de su genotipo), sumando la contribución de ambos genotipos tendremos un total de 6611 alelos M ($3574 + 3037 = 6611$), del total de 12258

alelos de los 6129 individuos (porque cada uno lleva dos alelos), la frecuencia del alelo M sería entonces $6611/12258 = 0.5393$, o si bien seguimos las formulas anteriormente citadas tendremos que:

$$p(M) = 2MM + MN / 2N \rightarrow p(M) = 2(1787) + 3037 / 2(6129) = 0.5393$$

La frecuencia del alelo N puede calcularse de la misma forma, por el conteo de los alelos en los homocigotos y heterocigotos, o también siguiendo la restricción de que en un sistema dialélico $(p + q) = 1$, y si ya tenemos el valor de p es fácil obtener el valor de q , puesto que $q = 1 - p$.

3.10.3 ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Existe una gran diversidad de estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos de fácil comprensión.

Los estadísticos más empleados son: Porcentaje de *loci* Polimórfico, el número medio de alelos por *locus*, la Heterozigosidad (esperada y observada), el Índice de contenido Polimórfico.

3.10.3.1 HETEROCIGOSIDAD (H)

Parámetro indicativo de la cuantía del polimorfismo y eficacia de cada marcador genético. Este valor representa la probabilidad de que dos alelos del mismo *locus* tomados al azar en una población sean distintos. De igual manera, la frecuencia de heterocigotos es un dato importante que representa la variación dentro de una población.^(37,38)

La Heterozigosidad para un *locus*, se define como el número de individuos heterocigotos observados respecto al total analizado, y esta puede expresarse matemáticamente de la siguiente manera;

$$H = 1 - \sum_{I=1} p_i^2$$

Siendo p_i la frecuencia génica del alelo i en un *locus* de m alelos.

Para el ejemplo del grupo sanguíneo MN tenemos que:

$$H = 1 - (0.5393^2 + 0.4607^2) = 1 - 0.5031 =$$

$$H = 0.4969$$

Una estimación no sesgada de la Heterozigosidad puede obtenerse multiplicando el valor anteriormente obtenido por $2N/2N-1$, donde N es el tamaño de la muestra. Esta corrección fue propuesta por Nei (1978), y debería realizarse cuando se están estudiando muestras de tamaño reducido.

$$H_{\text{no sesg}} = 0.4969 \times (2 \times 6129 / 2 \times 6129 - 1) = 0.4969$$

En este caso no hay diferencias entre ambas heterocigosidades puesto que el tamaño muestral es grande.

3.10.3.2 ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO (PIC)

El PIC es similar al valor de Heterozigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en una población de acuerdo a las frecuencias de los alelos, para su cálculo se ha de multiplicar la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad que sean informativos, es decir que se pueda identificar de que progenitor procede el alelo. (7,37)

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i-1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

3.10.3.3 PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN (PE)

Esta probabilidad se define como la probabilidad de que un sistema genético específico dará evidencias que conducirán a la exclusión de un sospechoso, ó a descartar una supuesta paternidad de un individuo. Es un método muy común para cuantificar la validez de un sistema genético. (20, 44)

En los sistemas genéticos codominantes de dos alelos, la probabilidad de exclusión a priori (PE) es:

$$PE = pq (1-pq)$$

Donde p y q representan las frecuencias génicas de los alelos bajo consideración.

Obviamente, si la frecuencia de cualquier alelo es 0 ó 1, entonces la probabilidad de exclusión a priori es 0, ya que la población es homogénea para ese alelo. Cuando la frecuencia génica alcanza un valor entre 0 y 1, la probabilidad de exclusión a priori se incrementa desde un valor mínimo de 0 hasta un valor máximo de 1 . Este valor máximo se da cuando todos los alelos del sistema genético tienen igual frecuencia y se lo determina de la siguiente manera:

$$PE_{\max} = \frac{(K-1) (K^3 - K^2 - 2K + 3)}{K^4}$$

Para un sistema de K alelos. Cuando K = 2, la probabilidad máxima de exclusión a priori ocurre cuando las frecuencias son iguales a 0.5 y este valor es de 0.188. Otros valores son fácilmente computables (por ejemplo, si K = 3, PE = 0.370, ó si K = 4, PE = 0.504).

Si retomamos el ejemplo del grupo sanguíneo MN y le calculamos el valor de PE sería:

$$PE_{(MN)} = 0.5393 \times 0.4607 \times (1 - (0.5393 \times 0.4607)) = 0.2485 \times 0.7515 =$$
$$PE_{(MN)} = 0.1867$$

Esto quiere decir, que en un caso de paternidad con este sistema se podrán descartar a un 18.67 % de los varones de la población como padres biológicos.

En el caso de sistemas genéticos multialélicos codominantes, el cálculo de la probabilidad de exclusión a priori resulta más complicado, aunque se ha propuesto una fórmula relativamente sencilla para el caso general de K alelos:

$$PE = a_1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$$

donde:

$$a_n = \sum_{i=1}^n X_j^n$$

y X_j es la frecuencia de cada uno de los alelos.

La eficacia de varios sistemas para excluir a un individuo, cuando se usan conjuntamente, puede ser cuantificada mediante el cálculo de la probabilidad de que una persona acusada sea eliminada por una o más series de sistemas genéticos. Esto es, si las probabilidades de exclusión a priori para una serie de sistemas genéticos son representadas por E_1, E_2, \dots, E_m , entonces la probabilidad de exclusión a priori total es:

$$PE_{total} = 1 - (1 - E_1)(1 - E_2)\dots(1 - E_m)$$

Donde m representa el número total de sistemas involucrados

3.10.3.4 PODER DE DISCRIMINACIÓN (PD):

Este parámetro estadístico se define como la probabilidad de que dos individuos no relacionados y tomados al azar puedan ser diferenciados genéticamente mediante el análisis de un marcador o conjunto de marcadores genéticos. Este puede ser calculado de la siguiente manera;⁽³⁷⁾

$$PD = 1 - PI$$

Para el ejemplo del grupo sanguíneo MN tenemos que:

$$PD = 1 - 0.6241$$

$$PD_{(MN)} = 0.3759$$

Para varios sistemas independientes, la Probabilidad de Discriminación Conjunta (PDc) será:

$$PDc = 1 - P_{Ic}$$

3.10.3.5 LA DERIVA GENETICA

Las frecuencias génicas pueden cambiar por razones puramente aleatorias, lo que comúnmente se conoce como deriva genética, debido a que cualquier población consta de un número finito de individuos. La frecuencia de un gen por ello puede cambiar de una generación a otra gracias a lo que se llama errores de muestreo, ya que de todos los genes de la población solo una pequeña fracción pasara a la siguiente (por lo mismo también es posible que salgan mas de 50 caras al lanzar una moneda 100 veces).

Si en una población de 1000 individuos, la frecuencia es de 0,5 en una generación, en la siguiente generación puede ser al azar, de 0.505 o 0.493, a causa de la producción fortuita de unos pocos más o unos pocos menos descendientes de cada genotipo. En la segunda generación habrá otro error de muestreo que ahora trabaja sobre la nueva frecuencia génica, así que la frecuencia de "a" puede llegar de 0.505 a 0.498. Este proceso de fluctuación aleatoria continúa de generación en generación, sin que se tome en cuenta las frecuencias fenotípicas, las cuales dependen a su vez del grado de dominancia que manifiestan los diferentes alelos.

El equilibrio en las frecuencias genotípicas se mantiene a través de cruzamientos fortuitos, siendo determinadas las frecuencias absolutas de los fenotipos por la

frecuencia de los genes, siempre y cuando no se modifique la frecuencia de los genes, permaneciendo constantes las frecuencias genotípicas.

3.11 ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.11.1 DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD.

Según los resultados que se obtienen de acuerdo al fin que se sigue, los mismos no dejan de ser complicados a la hora de ser evaluarlos por lo que se hace indispensable el saber interpretar cada uno de los datos que se reporta, en tal sentido la exclusión de la paternidad es la demostración científica de que un varón está equivocadamente acusado de una determinada paternidad. Basándose en las leyes de la herencia existen dos reglas clásicas de exclusión de paternidad, las de primer y las de segundo orden.

La primera regla se cumple cuando el hijo posee un alelo que está ausente en la madre y en el presunto padre, por ejemplo:

Tabla 4. Perfiles genéticos del Padre alegado, hijo y madre en un caso de Exclusión de Paternidad

Presunto padre	Hijo	Madre
11/ 12	10/13	13/14
6/9	8/10	8/8
11/13	7/8	7/11
8/8	9/11	11/12

Cuando hay incompatibilidad con la primera regla, la exclusión es concluyente

Sin embargo, con los marcadores de ADN como los STR la exclusión definitiva debe basarse por lo menos en dos incompatibilidades a pesar de la primera regla debido a la consideración de la tasa de mutación de estos *loci*.

Con todos estos sistemas surgirán más incompatibilidades y el resultado final será la exclusión. Si la incompatibilidad se repite en dos o más sistemas la exclusión es concluyente. Si aún aumentando el número de sistemas la exclusión sigue siendo una sola debe mantenerse una conducta prudente en su valoración y calcular la probabilidad de paternidad, ignorando el sistema que dio lugar a tal situación. La alternativa de la exclusión de la paternidad es la **inclusión**, compatibilidad que ocurre cuando el presunto padre posee todos los alelos de origen no materno presentes en el niño.

Tabla 5. Perfiles genéticos del Padre alegado, hijo y madre en un caso de Inclusión de Paternidad

Presunto padre	Hijo	Madre
11/ 12	12/13	13/14
6/9	8/9	8/8
7/8	7/8	7/11
8/8	8/11	11/12

Esta paternidad se asigna en términos de probabilidad o índice de paternidad (IP), basada en la probabilidad de exclusión.

Por un lado se determina el potencial de cada sistema que se basa en excluir a un varón tomado aleatoriamente de la población en general y de igual manera se calcula

la probabilidad de que el presunto padre haya contribuido al genotipo del probable hijo.

Para ello se calcula la probabilidad de paternidad (W) según la fórmula siguiente:

$$W = X / (X+Y)$$

Donde X es la probabilidad de que el hijo provenga de esa pareja asumiendo que el presunto padre sea el padre biológico del hijo, es decir, que sea él quien haya transmitido el alelo de origen paterno; Y es la probabilidad de que sea un hombre al azar en la población el que transmita el alelo paterno tomando a la madre como verdadera madre biológica del niño.

Para hallar el valor de Y se necesita la frecuencia del alelo paterno en la población general, (base de datos poblacionales) por ello antes de aplicar el análisis de ADN para la determinación de la paternidad es necesario conocer las frecuencias de los alelos a los que corresponden los marcadores polimórficos considerados en el estudio en la población a la que pertenecen los individuos sometidos a la investigación de paternidad. ⁽³⁵⁾

Las bases del cálculo de la paternidad en la prueba positiva se basan en el Teorema de Bayes, obra de un pastor presbiteriano publicado en 1763. El análisis bayesiano considera una serie de hechos que forman parte de un experimento aleatorio o al azar. Este teorema es una consecuencia inmediata de la ley de la multiplicación de la probabilidad que sirve para conocer las probabilidades finales de un suceso a partir de las probabilidades iniciales.

$$IP = \frac{\text{Pro. } \text{♀} \rightarrow b \times \text{Prob. } \text{♂} \rightarrow a + \text{Pro. } \text{♀} \rightarrow a \times \text{Prob. } \text{♂} \rightarrow b}{\text{Pro. } \text{♀} \rightarrow b \times f_a + \text{Pro. } \text{♀} \rightarrow a \times f_b}$$

fa, fb = frecuencias alélicas provenientes de la base de datos poblacional

La garantía mínima de que un resultado pueda ser de amplia utilidad ya sea en casos penales o civiles es de que el mismo debe alcanzar porcentajes iguales o superiores a 99.99%. (7, 18, 26)

3.11.2 IDENTIFICACIÓN CRIMINAL.

Al analizar polimorfismos genéticos en evidencias biológicas de procesos criminales (como manchas, material biológico o muestras de semen producto de violaciones) y si se trata de compararlos con un perfil genético de un probable sospechoso, puede suceder dos situaciones: que no coincidan en uno ó varios de los marcadores utilizados o que coincidan todos.

En el primer caso podemos decir que la muestra analizada no se corresponde con el sospechoso estudiado. Cuando sucede lo contrario se debe conocer la probabilidad de que esa mancha de sangre, pelo o semen provengan de ese individuo.

La forma de valorar científicamente esa probabilidad es lo que se conoce como **Índice Forense** ó Razón de Verosimilitud ó *Likelihood Ratio (LR)*.

En estos casos existen dos hipótesis posibles mutuamente excluyentes: C, el sospechoso cometió el crimen y \hat{c} , el acusado no ha cometido el crimen lo que implica asumir automáticamente que algún otro lo hizo.

De estas dos hipótesis se plantea el LR como una derivación del análisis bayesiano:

$$LR = \frac{\text{Probabilidad de la evidencia dada la culpabilidad}}{\text{Probabilidad de la evidencia dada la inocencia}}$$

El resultado obtenido del cálculo del LR será un aporte científico para que el juez junto a su creencia de culpabilidad o no y por las pruebas presentadas, indicios, etc., pueda determinar la probabilidad de culpabilidad de un individuo.

Supongamos un hecho delictivo donde se recupera una muestra biológica que presuntamente pertenece al perpetrador del crimen. En dicho crimen se encuentran involucrados solo dos personas; la víctima y el victimario. Se cuenta con un sospechoso y se quiere saber la probabilidad de que sea el quien halla cometido el crimen.

Se elaboran los perfiles de identidad genética de la víctima, el sospechoso y la evidencia biológica hallada en la escena del crimen de lo cual se obtiene:

Individuo	Genotipo	
	CSF1PO	TPOX
Víctima	10/12	11/11
Sospechoso	11/12	8/8
Muestra Biológica	11/12	8/8

Se procede a determinar el LR, donde el valor de X será igual a 1 siempre que exista concordancia entre el sospechoso y la muestra biológica hallada en la escena del crimen y que se presuma sea de él. Cuando no existe concordancia será 0 y quedara inmediatamente excluido como perpetrador del crimen, o por lo menos como donador de esa muestra biológica encontrada en la escena del crimen.

Para hallar el valor de Y se toman en cuenta las frecuencias alélicas de los alelos hallados en la muestra biológica, puesto que lo que se trata de determinar es si esa muestra fue donada por otra persona diferente del sospechoso de la población de referencia.

Cuando el genotipo hallado es heterocigoto:

$$LR = 1/2f_{afb}$$

Cuando es homocigoto:

$$LR = 1/a^2 \text{ o } b^2$$

Continuando con el ejemplo anterior, para el sistema CSF1PO, el genotipo coincidente con el sospechoso es 11/12, (para este ejemplo; frecuencia del alelo 11= 0.287 y frecuencia del alelo 12 = 0.324)

$$LR = 1/2(0.287)(0.324)$$

$$LR = 5.377$$

Aquí lo que nos indica es que 1 de aproximadamente cada cinco personas pudo ser el que dejó la evidencia biológica, o que 1 de cada 5 personas tiene ese genotipo.

Para el segundo sistema estudiado TPOX, el perfil coincidente es 8/8 (la frecuencia del alelo 8 = 0.482), el LR sería:

$$LR = 1/(0.482)^2$$

$$LR = 4.3043$$

Cuando se establece en LR para cada sistema estudiado se multiplican entre si y se obtiene el LR final. En nuestro ejemplo al multiplicarlos LR para los sistemas CSF1PO y TPOX nos da un $LR_{TOTAL} = 23.1442$, lo que quiere decir que 1 de cada 23 personas pudo haber aportado la evidencia biológica considerando solo estos dos sistemas. Por supuesto, esta cifra aumenta considerablemente hasta ser prácticamente conclusiva cuando el número de sistemas estudiados también se incrementa.

En los casos forenses es muy frecuente encontrarse con mezclas de perfiles de ADN en muestras biológicas de una escena del crimen. Por lo que resulta de suma importancia reconocer e interpretar de manera adecuada los perfiles mezcla en Genética Forense.

Un perfil mezcla, es aquel que procede de más de un individuo y se pone en manifiesto casi siempre por la presencia en la mayoría de los loci estudiados de más de dos bandas. Incluso las diferentes bandas que aparecen en un marcador pueden estar desbalanceadas, de manera que hay bandas más marcadas que otras y de cierta

forma esto nos puede ayudar a determinar que cantidad de contribución hay de cada perfil a la mezcla.

Protocolo para identificar un perfil mezcla:

- ◆ Identificar la presencia de una mezcla. Designar los alelos sin ambigüedad.
- ◆ Identificar el número posible de contribuciones de la mezcla.
- ◆ Estimar la proporción relativa de los individuos que componen la mezcla y las combinaciones posibles de genotipos
- ◆ Comparar con perfiles genéticos obtenidos en las muestras de referencia.
- ◆ Valoración de los resultados obtenidos y cálculos estadísticos si procede.

Para el caso de las mezclas la Razón de Verosimilitud o el **LR** es el parámetro que habitualmente se calcula. Se supone que se ha determinado sin ambigüedad que el perfil genético obtenido es una mezcla, que se ha determinado el número posible de contribuyentes de la mezcla y que se ha comparado con las muestras de referencia, y se obtiene una compatibilidad para todos los marcadores estudiados con algunas o todas las muestras de referencia de que se dispone.

Se trata de valorar la fuerza de la asociación y de asignar un valor numérico a los resultados, dependiendo siempre de las hipótesis que se planteen que es lo fundamental, algo que el perito suele formular en base a los antecedentes del caso conocidos y de las personas de las que se dispone su perfil genético.⁽³⁷⁾

En caso de que se presuma que las muestras a analizar se encuentren contaminadas con material genético proveniente de diferentes individuos existirían solo tres posibles LR diferentes que se pueden dar y que serían:

LR1: se trata de valorar un perfil genético que es compatible con una mezcla de restos celulares de víctima y del sospechoso analizado y dicho perfil ha sido obtenido a partir de una muestra recogida del cuerpo de la víctima (por ejemplo una toma vaginal con semen) por lo que no se duda que en dicha muestra existan restos

celulares de células descamativas del epitelio vaginal de la víctima, lo que hay que calcular es la probabilidad del sospechoso. Las dos hipótesis mutuamente excluyentes de la LR serían:

- ♦ C: La muestra es una mezcla de la víctima y el sospechoso.
- ♦ \hat{C} : La muestra es una mezcla de la víctima y una persona no relacionada y tomada al azar de la población en estudio.

$$LR1 = \frac{\text{Víctima + Sospechoso}}{\text{Víctima + Otra persona desconocida}}$$

LR2: se trata de valorar un perfil genético que es compatible con una mezcla de restos celulares de víctima y del sospechoso y dicho perfil ha sido obtenido a partir de una muestra recogida del lugar donde suceden los hechos por lo que no se puede asegurar que existan restos celulares de la víctima, lo que hay que calcular es la compatibilidad de ambos tanto la víctima como del sospechoso. Las dos hipótesis mutuamente excluyentes de la LR serían:

- ♦ C: La muestra es una mezcla de la víctima y el sospechoso.
- ♦ \hat{C} : La muestra es una mezcla de dos personas no relacionadas y tomadas al azar de la población en estudio.

$$LR2 = \frac{\text{Víctima + Sospechoso}}{\text{Dos personas desconocida}}$$

LR3: Se trata de valorar un perfil genético que es compatible con una mezcla de restos celulares del sospechoso estudiado y otro individuo desconocido (ya que en la muestra se detecta un perfil que no es compatible con ninguna de las muestras de referencia analizadas), lo que hay que calcular es la compatibilidad del sospechoso conocido. Las dos hipótesis mutuamente excluyentes de la LR serían:

- ◆ C: La muestra es una mezcla del sospechoso y otra persona desconocida.
- ◆ \hat{C} : La muestra es una mezcla de dos personas no relacionadas y tomadas al azar de la población en estudio.

$$LR3 = \frac{\text{Sospechoso + Otra persona desconocida}}{\text{Dos personas desconocida}}$$

Ahora como ejemplo vamos a calcular los distintos LR cuando en la mezcla se consiguen 4 alelos.

En la mezcla se detectan los 4 alelos **abad** y la víctima es **ab** y el sospechoso analizado es **cd**.

En el LR1: C = 1 y \hat{C} = necesariamente el desconocido será un heterocigoto cd y su frecuencia será 2fcfd.

$$LR1 = 1/2fcfd$$

En el LR2: C = 1 y \hat{C} los dos desconocidos serán todas las combinaciones posibles de los 4 alelos:

$$(ab \times cd) \times 2 = (2fafb \times 2fcfd) \times 2 = 8fafbfcfd$$

$$(ac \times bd) \times 2 = (2fafc \times 2fbfd) \times 2 = 8fafbfcfd$$

$$(ad \times bc) \times 2 = (2fafd \times 2fbfc) \times 2 = 8fafbfcfd$$

$$\text{Total} = 24fafbfcfd$$

$$LR2 = 1/24fafbfcfd$$

Para el LR3: C = necesariamente el desconocido será heterocigoto ab y su frecuencia fafb y \hat{C} = los dos desconocidos serán todas las combinaciones posibles de los cuatro alelos, que antes se calculo, 24fafbfcfd.

$$LR3 = 2fafb/24fafbfcfd$$

$$LR3 = 1/12fcfd$$

Para el cálculo de estas LR con tres y con dos alelos o cualquier otra más complicada (mezclas complejas de más de dos individuos), se utiliza la tablado Weir y col. (1997). Estas se emplean teniendo en cuenta la siguiente fórmula tanto para el numerador como para el denominador ⁽⁴⁴⁾

$$P_x [U/E]$$

Siendo:

X = n° de desconocidos

U = Los alelos que tiene que llevar el desconocido.

E = Todos los alelos de la mezcla

3.12 BASE DE DATOS GENÉTICOS

Con esta denominación y con otras similares (Bases de Datos Genéticos, Base de Datos Biológicos) se hace referencia al archivo sistemático de material genético o muestras biológicas de determinados grupos de población para ser analizadas en determinadas circunstancias.

Nos referimos a ellos de modo general como BASE DE DATOS GENETICOS (BDG) los cuales se pueden dividir en varias categorías dependiendo del grupo de personas que abarca. ⁽³⁵⁾

3.12.1 BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS

La creación de una base de datos generales de frecuencias alélicas de toda una población repercute en un problema más que de realización en un problema económico, social y religioso, esto se debe a que si se tratase de obtener una base de datos de todos los integrantes de una población o al menos de una cantidad de individuos cuya característica sea representativa para una población, se deben considerar aspectos tales como: contar con una solvencia económica sólida capaz de cubrir las necesidades que demanda su ejecución, así también por su parte la

población debe ser conciente de que el aporte voluntario de sus muestras contribuirá de gran manera al fin propuesto y finalmente vencer los dogmas religiosos que se constituyen en un problema por considerarse la realización de este proyecto como una violación a la intimidad genética de los individuos.

En realidad un plan de esta magnitud en muchas de las naciones queda sin ejecución, no obstante algunos países tales como Inglaterra, Holanda cuentan con una base de datos casi completa de toda su población. Así como gran parte del continente americano que cuenta al menos con una base de datos de regiones específicas de su población, pero ahora nosotros nos encontramos en el camino de poder contar con una base de datos de frecuencias alélicas propia de nuestra región, independientemente de todos los problemas antes mencionados ⁽⁷⁾

Esta base de datos debe contar con todas las frecuencias alélicas determinadas para cada marcador (TPOX, THO1, CSF1PO, F13A01, FESFPS, Vwa, D13S317, D16S539, D7S820), dependiendo del número de marcadores que se utilizan para caracterizar la población que en nuestro caso son los anteriormente mencionados. ^(25, 39)

El hecho de contar con una base de datos propia de nuestra población, presenta un gran valor informativo teniendo en cuenta que dichos valores obtenidos serán de gran utilidad en la valoración probabilística para identificar vínculos biológicos o delitos enmarcados en el ámbito delictivo.

Teorema bayesiano

$$IP = \frac{\text{Pro. } \text{♀} \rightarrow b \times \text{Prob. } \text{♂} \rightarrow a + \text{Pro. } \text{♀} \rightarrow a \times \text{Prob. } \text{♂} \rightarrow b}{\text{Pro. } \text{♀} \rightarrow b \times fa + \text{Pro. } \text{♀} \rightarrow a \times fb}$$

fa ,fb = Frecuencias alélicas que proviene de la base de datos, cuyo valor varia o depende del alelo y el marcador analizado

El hecho de utilizar base de datos de frecuencias alélicas de poblaciones tales como las Hispano americanas para la valoración estadística en casos de vínculos biológicos

e identificación de individuos en nuestra población conlleva a un error intrínseco en la valoración probabilística, ya sea determinando el índice de paternidad o la razón de verosimilitud, que son parámetros importantes de reporte, de inclusión o exclusión, incriminación o no incriminación del imputado, contando con datos propios al menos se reduciría en gran manera este error estadístico. Pese a que la Base de datos Hispanoamericanas provistas por la línea *Promega* presenta bastante relación con nuestras frecuencias lo cual no justifica que la utilicemos como una base de referencia debido a que nos lleva a disminuir aunque en forma sutil los valores reales.^(44,45)

Gracias a esta base de datos podremos evaluar e identificar la presencia de alelos propios de nuestra región considerando que nuestra población es ampliamente heterogénea, pluricultural, multiétnica y extremadamente mestiza.

3.12.2 BASE DE DATOS DE PROFESIONALES EN RIESGO

Países altamente desarrollados protegen de gran manera a personas profesionales consideradas de alto riesgo donde las mismas personas voluntariamente donan muestras biológicas tales como saliva, sangre, etc. para que las mismas sean analizadas y en casos de accidentes con vistas a solucionar todas las cuestiones civiles que pueden presentarse ante la falta de identificación del cadáver o de sus restos.

En todos los casos se aprecia un beneficio en la realización de este tipo de bancos de base de datos de frecuencias alélicas, desde el punto de vista social se ha planteado la conveniencia de proceder al archivo de estas muestras en determinados individuos con vistas de evitar un daño social.⁽¹⁵⁾

3.12.3 BASE DE DATOS JUDICIALES

Hoy en día son muchos los casos judiciales en Estados Unidos de América y Europa que dependen de una investigación de ADN para ser resueltos. El crimen moderno

hoy por hoy deja pocas huellas y rastros por lo que en estos casos necesariamente debemos recurrir a la investigación del ADN, esto porque la Investigación por esta vía no da lugar a dudas para establecer la confirmación de la identidad de un individuo; por lo que cuando se usa esta tecnología en contra del crimen moderno no hay dudas de que los resultados en la investigación son los mas acertados.

La pregunta central a refutar es ¿Para que tipo de crímenes debiera crearse este registro? desde el punto de vista legal o sea desde la generación de la ley es donde pueden partir los límites en cuanto a quienes y al número de personas que estarían incluidas en este registro. Este proyecto de ley permite a los legisladores generar un amplio número de personas que pertenezcan a este registro y que además sea efectivo, es decir que en la medida que más personas estén registradas es más efectivo porque es más fácil de comparar. El sistema CODIS (traído de EEUU y generado por el FBI) permite tomarles las muestras a las personas condenadas y la ley determinará si se le puede tomar solo a los condenados o a los procesados.

Además, el registro tiene dos partes, en primer lugar está el de los condenados –que es nuestra propuesta al gobierno– y en segundo lugar está el registro de las víctimas y de las prendas o evidencias. Sin embargo, una vez que se soluciona el problema los datos de la víctima salen del registro. ^(15,17)

3.12.4 BASE DE DATOS CRIMINALES

Ahora bien concretamente la discusión se ha centrado en los casos criminales, hablando de la necesidad de proceder al archivo de las frecuencias alélicas de todos los criminales limitándose en un principio a autores de delitos graves, homicidio y agresiones sexuales.

Una base de datos biométrica menos extensa la constituye una base de datos parcial que contenga únicamente a criminales y sospechosos y no así a la población general.

Por ejemplo, podrían ser cámaras gubernamentales de reconocimiento facial ubicadas en lugares públicos, la gente sería observada, pero presumiblemente solo para ver si calzan con una cara que se encuentre en la base de datos. Se alega que la recolección de la información concerniente a los criminales ya ha tomado lugar bajo los procedimientos establecidos en la Cuarta Enmienda de la Constitución estadounidense y que ninguna información es recolectada de personas que no estén en la base de datos. Sin embargo, muchos críticos dudan razonablemente de que se pueda confiar en los gobiernos el hecho de descartar la información de gente inocente recolectada de manera accidental. El uso de la biometría con el fin de identificar y seguirles la pista a individuos incluso en lugares "públicos", puede constituir una inspección desmedida y ser fácilmente abusada. Se requiere de estrictas salvaguardas, pero éstas no existen hoy en día.

¿Cómo sería el control de las bases de datos en una eventual legislación? Además se deben salvaguardar una serie de barreras informáticas, por lo tanto es un sistema de control informático. Esto deberá estar probablemente establecido en el reglamento, ya que son aspectos cambiables desde el punto de vista de las instancias de seguridad que se quieran cubrir. Es por eso que los legisladores deben dejar completamente establecido por ley quienes son los que tendrán acceso a esta información y la pregunta del millón ¿Para que tipo de crímenes debiera crearse este registro?.⁽³⁴⁾

Al respecto, hay varias posibilidades. La primera es que se establezca para delitos que tienen una cierta gravedad, es decir aquellos que tienen una pena superior a 3 años, esa es una alternativa con la que operan varios Estados que tienen este tipo de base de datos. Otra es que tengamos una selección de los delitos más graves, por ejemplo, homicidios, violaciones, secuestros, entre otros. Y una tercera alternativa es que sea para todos los delitos. Ahora, si el legislador cree que deben introducirse además otras figuras, debe evaluarse desde el punto de vista jurídico que puede resultar inconveniente, debido a que podrían haber problemas de tipo técnico en términos de que se multipliquen los exámenes que deban hacerse.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

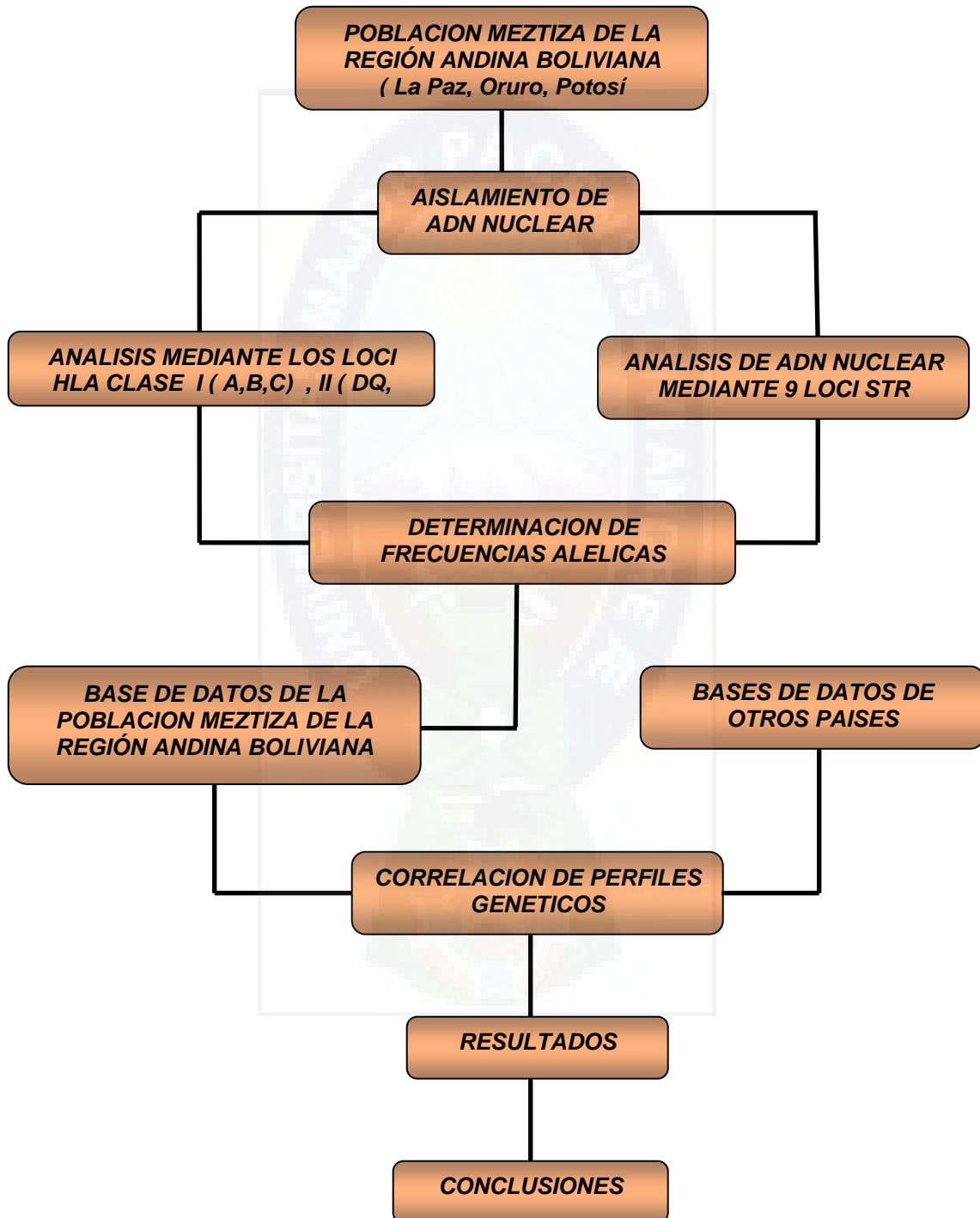
Crear una base datos de frecuencias alélicas de 9 *loci* STR y *loci* HLA de ADN nuclear en la Población Mestiza de la Región Andina Boliviana (La Paz, Oruro, Potosí).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas de 9 *loci* de STR de ADN nuclear en la Población Mestiza de la Región Andina Boliviana.
- Determinar las frecuencias alélicas de los *loci* HLA clase I (APC) y HLA clase II (DR; DQ) en la Población Mestiza de la Región Andina Boliviana.
- Establecer las relaciones de concordancia y similitud de las frecuencias alélicas entre la población en estudio y la población hispanoamericana.
- Establecer los parámetros estadísticos poblacionales provenientes de la población en estudio.
- Determinar el poder de discriminación de los 9 sistemas empleados como métodos de identificación humana.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 DISEÑO METODOLOGICO



El presente trabajo fue realizado durante los meses de mayo del 2003 a marzo del 2005 en la Unidad de Inmunogenética y la Unidad de Diagnóstico y Tipificación Molecular del “Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud” SELADIS dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés, en la Ciudad de La Paz.

Laboratorio de genética forense del “Instituto de Investigaciones Forenses, Fiscalía General de la República La Paz - Bolivia “IDIF”.

5.2 POBLACION

En este estudio se tomaron dos poblaciones una que corresponde al estudio y tipificación de los 9 *loci* STR cuya población exacta es de 30 individuos no emparentados entre si, cuya procedencia coincide con la población mestiza de la región andina Boliviana, teniendo a 16 individuos de la ciudad de La Paz, 8 de Oruro y 6 de Potosí no incluyéndose a caucasoides y negroides, las edades de las personas en estudio oscilan entre 25 y 40 años.

Por otro lado se analizaron 150 muestras y su tipificación y obtención de frecuencias alélicas de los *loci* HLA, A, B, Cw, DR Y DQ en la población mestiza andina boliviana.

5.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras tomadas para la tipificación de los 9 *loci* STR en el presente estudio fueron muestras de sangre por lo que se extrajeron 5 ml de sangre periférica por punción venosa, recogiendo en tubos estériles conteniendo EDTA al 7% como anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas en alícuotas de 500µl de sangre total a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Así también las muestras para realizar la tipificación de los *loci* HLA, A, B, Cw, DR Y DQ en el presente estudio fueron muestras de sangre por lo que se tomaron 5 ml de sangre periférica por punción venosa recogándose en tubos vacutainer estériles conteniendo EDTA al 5% .⁽³²⁾

5.3 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

5.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE TOTAL (TIPIFICACIÓN STR)

Se utilizó el método de extracción orgánico “fenol/cloroformo–alcohol Isoamílico” enzimático “Proteinasa K”.

Tomamos una alícuota de 500µl de sangre misma que se resuspendió en 500 µl de TEC-SDS posteriormente se le agrego 20 µl de Proteinasa K seguidamente se agito manualmente e incubo a 56°C durante 2 hora (acción tensioactiva enzimática).

Las muestras obtenidas luego de la incubación fueron tratadas con solventes orgánicos: dos veces con fenol y dos con Cloroformo/Isoamílico, recuperándose cada vez la fase acuosa. Este procedimiento permite extraer las proteínas y lípidos que impurifican el material genético, luego se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio y dos volúmenes y medio de Etanol absoluto y se centrifugó a 14000 rpm. Luego de un proceso de rehidratación y la aplicación de la fuerza centrifuga tuvimos como resultado la precipitación del ADN, teniendo como paso final de la extracción el resuspender el material genético “ADN” en agua libre de nucleasas y almacenamos a -20°C hasta su pronto uso.

5.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE TOTAL (HLA)

El ADN fue extraído de linfocitos periféricos de la sangre. Las células se lisan en el Buffer TritonX-100) y fueron digeridas con el Proteinasa K (10mg/ml) a 37°C por 12 horas. La proteína fue quitada con solución de fenol cloroformo alcohol Isoamílico en una relación (25:24:1, v/v/v). El ADN fue precipitado en acetato de sodio (5 mol/l) y purificado en etanol, posteriormente fue diluido con agua desionizada y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

5.3.3 OBTENCIÓN DE LOS PERFILES GENÉTICOS POR EL MÉTODO DE LOS STR

5.3.3.1 AMPLIFICACIÓN

Todos los perfiles genéticos fueron obtenidos en base a la utilización del método de los STR el mismo que se basa en la amplificación de secuencias cortas repetitivas. Para dicho fin empleamos el Kit de PROMEGA para 9 *loci* STR.⁽⁴⁶⁾

5.3.3.2 CUARTO BLANCO (PREPARACIÓN DEL MASTER MIX).

Se siguió el siguiente protocolo:

Descongelamos el agua estéril, Buffer 10 X STR, los primers y por último la taq polimerasa, los cuales una vez calculado el volumen total para cada reactivo del master mix según la cantidad de determinaciones que se van a realizar incluyendo los controles positivos y negativos se añaden manteniendo el orden descrito anteriormente y luego se alicuotan en tubos de 0.2 ml un volumen de 22.5µl del master mix. Una vez alicuotado se debe abandonar el cuarto estéril y pasar al ambiente donde se realizó la extracción del ADN.

5.3.3.3 CUARTO AZUL (EXTRACCIÓN DE ADN HUMANO)

La principal característica de este ambiente es el de ser único y exclusivo para realizar extracciones de ADN humano, debe ser relativamente estéril, teniendo en cuenta que bastaría contaminar con una gota de sangre, o simplemente con una micro gota de saliva ajena durante el proceso de extracción para que nuestra muestra nos provea de un perfil equivoco y no el real. Por otro lado este ambiente también cumple otra función importante que es el almacenamiento del ADN extraído, por lo que es el lugar ideal para que el mismo pueda ser trasvasado hacia el master mix.

El volumen suficiente para poder brindarnos un perfil de alta resolución se encuentra en un rango de 2.5 - 3µl de ADN extraído lo que equivale a unos 50-80ng de ADN, mismos que se añaden a los tubos ya rotulados en el cuarto blanco. No debemos olvidar que solo se añaden muestras en este lugar sino también los controles tanto positivos (ADN K562) como negativos (agua estéril).

5.3.3.4 CUARTO GRIS (AMPLIFICACIÓN STR)

Finalmente la etapa de amplificación termina en el cuarto gris donde se cuenta con el termociclador Perkin Elmer 9600, mismo que debe ser programado previo a la amplificación, dependiendo del protocolo de amplificación mismo que varia en función a los *loci* a analizar. En nuestro caso el protocolo utilizado es el siguiente:

Tabla 6. Temperaturas y Tiempos en la amplificación del PCR-STR Multiplex

STR multiplex	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Predesnaturalización	96°C	2min	1
Desnaturalización	94°C	1min	10
Hibridación	64°C	1min	
Extensión	70°C	1.5min	
Desnaturalización	90°C	1min	20
Hibridación	64°C	1min	
Extensión	70°C	1.5min	

Una vez concluido el protocolo de amplificación guardamos muy bien los amplicones a -20°C en lugar estéril hasta su pronta utilización.

Por otro lado también se puede constatar la amplificación sometiendo a los amplicones a una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5.3.3.5 CUARTO NEGRO (REVELADO)

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de Poliacrilamida en este ambiente de acuerdo al siguiente protocolo: ^(16, 46)

5.3.3.5.1 PREPARACIÓN DEL EQUIPO PARA LA CORRIDA ELECTROFORÉTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

- PREPARACIÓN DE LOS VIDRIOS:

Se remojaron los vidrios con hidróxido de sodio durante 24 horas y son enjuagados con agua desionizada, el tratamiento de los vidrios debe ser independiente evitando la contaminación del uno con otro.

▪ VIDRIO LARGO:

Este vidrio es de vital importancia por lo que previo a su uso se sumerge en una solución de NaOH al 10 % en lo posible toda la noche, posteriormente se secó y se limpió con etanol absoluto. Luego se extendió la solución repelente (gel repel) en todo el vidrio y se deja volatilizar por 5 minutos después de los cuales se limpió con agua desionizada. Luego se aplicó vaselina en los extremos laterales del vidrio donde se colocaron los espaciadores.

▪ VIDRIO CORTO:

El vidrio seco se limpio con etanol absoluto, esparciendose la solución de unión (Etanol, ácido acético y bind silane “ Methacryloxypropyltrimetoxisilane”) sobre

todo el vidrio, dejando volatilizar durante 5 minutos y finalmente se limpia con etanol al 95 % 3 veces.

Las soluciones usadas tanto en el vidrio corto como en el largo son altamente tóxicas por lo que es recomendable usar una campana de gases.

Posteriormente procedimos al montaje de las placas de cristal adaptando sus respectivos espaciadores sin olvidar engrasar los bordes con vaselina a fin de lograr la adherencia de los espaciadores a los cristales.

5.3.3.5.2 PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Se diluyó la urea en agua estéril desionizada misma que fue sometida a un proceso físico "calor" a fin de acelerar el proceso de disolución, posteriormente se añadió el tampón 10X dejando enfriar esta solución por unos minutos, seguidamente vertemos otra solución "acrilamida/bisacrilamida" a una concentración del 40% en una relación 19:1. Seguidamente se procede a un proceso de filtración al vacío, una vez terminada esta se vierten los catalizadores (TEMED y persulfato de amonio) de la reacción favoreciendo el mecanismo de polimerización. Inmediatamente se procede al cargado y vaciado del gel.

Para los fines indicados en este estudio procedimos a la preparación del gel de Poli(acrilamida) a una concentración del 4%, aunque debemos considerar que esta concentración debería ser al 6% debido a que alelos del *loci* D16S539 presentan un solapamiento entre algunos alelos de este marcador.

Una vez efectuado el vaciado del gel rápidamente insertamos el peine en el sentido y posición correcta dejando cumplir la polimerización durante 2 horas. ⁽⁴⁵⁾

5.3.3.5.3 PREPARACIÓN DE LA CUBETA DE ELECTROFORESIS.

Esta cubeta es de vital importancia por lo que su trato es el de mayor cuidado debido a que por la misma circulara un elevado voltaje eléctrico. Primeramente seleccionamos el programa apropiado en la fuente de poder según a nuestros fines, tomando en cuenta el voltaje, tiempo y temperatura, siendo estos los factores más importantes a considerar.

Inmediatamente verificamos que los compartimentos tanto superiores como inferiores de la cámara electroforética se encuentren correctamente cargados con tampón TBE 0.5 X.

Una vez verificado estos procedemos al montaje de las placas de vidrio sujetándolas con abrazaderas laterales a fin de evitar fuga de este compartimiento. Seguidamente verificamos que el contacto eléctrico del tampón con los geles se encuentre en perfecto estado, lo que nos da luz verde al siguiente paso que corresponde al calentamiento del equipo, debiendo este no sobrepasar los 50°C siendo esta la temperatura óptima para realizar una electroforesis de Poliacrilamida.

5.3.3.5.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Una vez obtenidas las muestras o amplicones de la PCR de STR estas deben ser sometidas nuevamente a un proceso de desnaturalización, así mismo deben seleccionarse en orden metódico a fin de obtener perfiles genéticos de fácil interpretación y lectura.

Alicuotar en un tubo de 0.2 ml, 2.5 µl de la muestra y añadir 2.5 µl de la solución de cargado 2x, seguir este procedimiento para cada una de las muestras y sistemas utilizados.

Agregar 2.5µl (50ng) de los marcadores de la ADN K562 (patrón de corrida) a 2.5µl del STR solución del cargamento de 2x para cada carril del marcador. Así mismo

agregar 2.5µl de la escalera alélica a 2.5µl del STR solución del cargamento de 2x para cada carril de la escala.

5.3.3.5.5 CARGADO DE LA MUESTRA

Desnaturalizar las muestras calentando a 95°C por 2 minutos y enfriarla inmediatamente en el hielo. Utilizar una jeringuilla que contenga buffer de 50-100 ml para limpiar los restos de urea. Una vez corroborada la ausencia de cristales de urea insertar cuidadosamente los dientes del peine aproximadamente a 1-2mm del gel. Cargar 5-6µl de cada muestra en los pozos respectivos. El proceso de cargamento debe durar el menor tiempo posible a fin de evitar que el gel se enfríe.

5.3.3.5.6 TINCIÓN DE PLATA

Posterior a la electroforesis vaciar los compartimientos del buffer y aflojar cuidadosamente las abrazaderas del gel, separando las placas de cristal del aparato y colocar las mismas en una superficie plana, retirar el peine y los espaciadores laterales. En un paso siguiente separar cuidadosamente las dos placas de cristal evitando que el gel se quede adherido a la placa más corta. Seguidamente llevarla a una bandeja plástica donde inmediatamente se procede a revelar el gel de la siguiente manera:

Inicialmente se vierte la solución fijadora o de parada (Ácido acético glacial más agua destilada) durante un tiempo de 20 minutos, seguidamente se lava la placa con agua destilada por tres veces consecutivas, posteriormente se añade la solución de (nitrato de plata más formaldehído) durante 30 minutos, nuevamente se procede a lavar con agua por un tiempo único de 10 segundos, luego se deja el gel en el revelador (carbonato de sodio, formaldehído, tiosulfato de sodio) hasta ver que los bordes de los puntos de siembra se oscurezcan paulatinamente, es en ese momento cuando se repite la etapa inicial por 5 minutos, por último enjuagar con agua Inti y dejar secar el gel a temperatura ambiente. ^(46,47)

5.3.4 OBTENCION DE LOS PERFILES GENETICOS DE LOS SISTEMAS HLA CLASE I Y CLASE II

Para la obtención de los perfiles genéticos u haplotipos del sistema HLA se procedió a la amplificación de las secuencias del mismo ubicadas en el brazo corto del cromosoma 6 utilizando la técnica de la PCR “reacción en cadena de la polimerasa” en una de sus variantes con los primers específicos para el PCR-SSP. ⁽⁶⁾

La mezcla de reacción incluye aproximadamente 75ng de ADN extraído, buffer de PCR que a su vez contiene [50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-Cl, (pH 8.3)] dNTPs (25mM).

Además el par de primers del control C3 y C5 positivos internos, fueron incluidos en todas las mezclas de reacción en una concentración cinco veces menor que los primers del alelo y grupo específicos.

La mezcla de reacción fue sujeta a 35 ciclos de la amplificación, cada desnaturalización a 94°C (30s), hibridizando a 58°C (30s) y la extensión a 72°C (60s), finalizando con una extensión de 180s a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel del agarosa.

Después de la adición del buffer de cargado, las mezclas de reacción de PCR fueron cargadas en los geles del agarosa tratados con bromuro de etidio. La corrida de los geles tuvo una duración de 15 minutos en el gel en buffer 0.5×TBE, después examinado en el transiluminador ultravioleta y documentado por fotografía.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La frecuencia de un alelo en una población se denomina frecuencia génica o alélica y se puede definir como “*el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos*”.

Para la aplicación de cualquier marcador genético en genética forense es fundamental determinar las frecuencias alélicas del sistema polimórfico en la población, realizando una estima de dichas frecuencias a través de un fenotipado muestral representativo dada la imposibilidad de fenotipar todos y cada uno de los integrantes de la población para obtener su valor exacto.

Hemos utilizado los siguientes parámetros estadísticos que nos indican la utilidad a priori de los marcadores:

- ✓ **Probabilidad de exclusión a priori (CE)**

$$CE = \sum_{i=1}^n p_i(1-p_i)^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i p_j (p_i+p_j) (1-p_i-p_j)^2$$

- ✓ **Poder de discriminación (PD)**

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

- ✓ **Poder de exclusión**

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

- ✓ **Índice Típico de Paternidad**

$$IP = (H+h)/2H$$

- ✓ **Índice de Contenido Polimórfico**

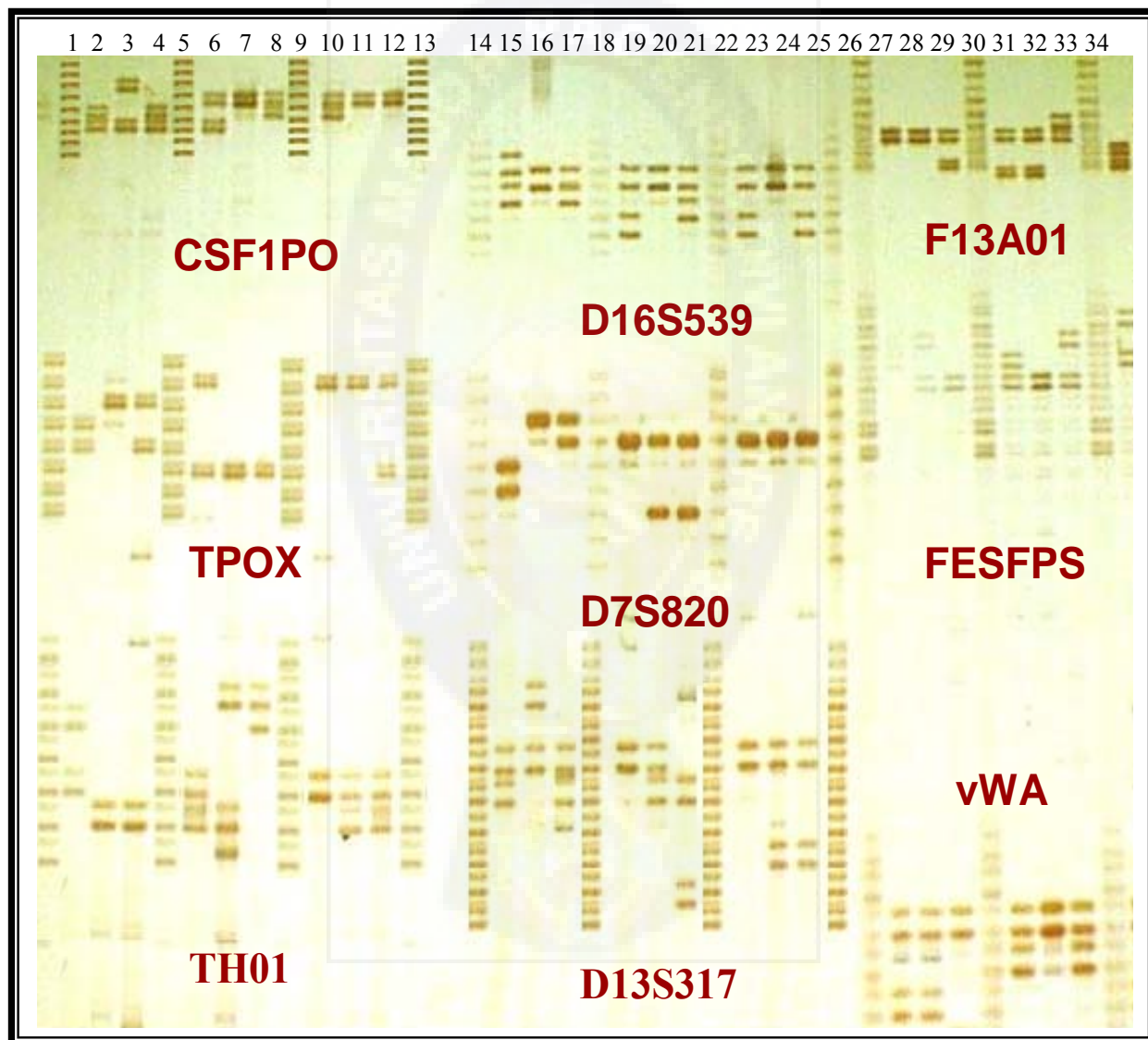
$$PIC = 1 - \sum_{i=a}^n \sum_{j \geq i}^n P_{ij}^2 - \left(\left(\sum_{i=a}^n \sum_{j \geq i}^n P_{ij}^2 \right)^2 + \sum_{i=a}^n \sum_{j \geq i}^n P_{ij}^4 \right)$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 OBTENCION DE PERFILES GENETICOS

En la figura 1 se muestran los perfiles genéticos obtenidos para los 9 *loci* STR de individuos no emparentados, analizados en el presente estudio.

Figura 10. Perfil genético de ADN de 9 *loci* STR.



Electroforesis en Geles de Poliacrilamida al 4% carriles 1, 5, 9, 13 marcador de peso molecular sistema CTT, marcadores CSF1PO, TPOX, TH01, carril 2,3,4,6,7,8,10,11,12 alelos de los individuos a analizar, carril 14, 18, 22, 26 marcador de peso molecular sistema SILVER STR, carriles intermedios individuos a analizar, carriles 27, 31, 34 marcadores de peso molecular sistema FFv, carriles intermedios alelos individuos analizado.

6.2 ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALELICAS DE 9 LOCI STR EN LA POBLACIÓN MESTIZA DE LA REGIÓN ANDINA BOLIVIANA

Figura 11. Sistema *CSF1PO*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

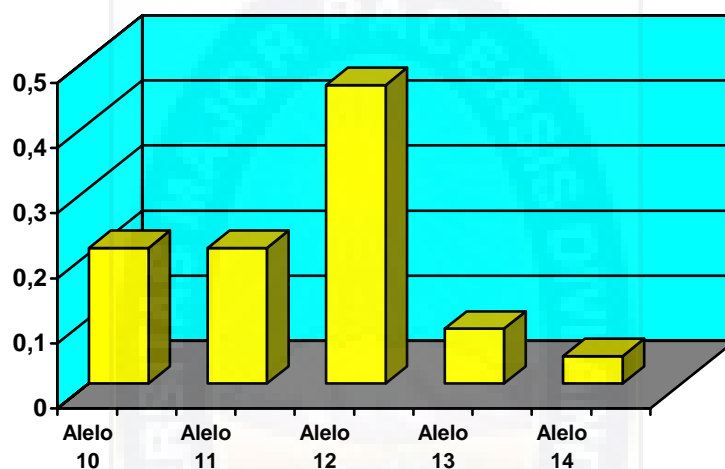


Tabla 7. Frecuencias alélicas del Sistema CTT para el marcador *CSF1PO*

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	7 (295)	0	0	
	8 (299)	0	0	
	9 (303)	0	0	
	10 (307)	0,208	0,043264	
CSF1PO	11 (311)	0,208	0,043264	0,738152
	12 (315)	0,458	0,209764	
	13 (319)	0,084	0,007056	
	14 (323)	0,042	0,001764	
	15 (327)	0	0	
TOTAL		1		

Como podemos observar en la figura 11 y tabla 7, el alelo que presenta una mayor frecuencia es el alelo 12 para el marcador CSF1PO igual a 0,458, y en menor proporción el alelo 14 igual a 0,042, para este mismo *locus*, cuyos resultados nos indican que el alelo 12 para el marcador CSF1PO se encuentra ampliamente distribuido en nuestra población en tal sentido es un marcador poco discriminativo a la hora de realizar un evaluación estadística para la identificación de individuos debido a que su elevada frecuencia es un indicativo de que exista una elevada probabilidad de que este se encuentre en un conjunto elevado de personas en nuestra población. Por el contrario el alelo 14 para este *locus*, al presentar una baja frecuencia en nuestra población nos hace tomarlo como un marcador ideal, el cual es ampliamente discriminativo a la hora de una evaluación estadística debido a que su baja frecuencia es un indicativo de que exista una baja probabilidad de que este se encuentre en nuestra población.

Por otro lado la diversidad genética dada para este marcador igual a 0,738 este valor nos hace pensar que las frecuencias alélicas encontradas para este marcador en nuestra población, se encuentran ampliamente distribuidas y diversificadas en nuestra población.

Figura 12. Sistema *THO1*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

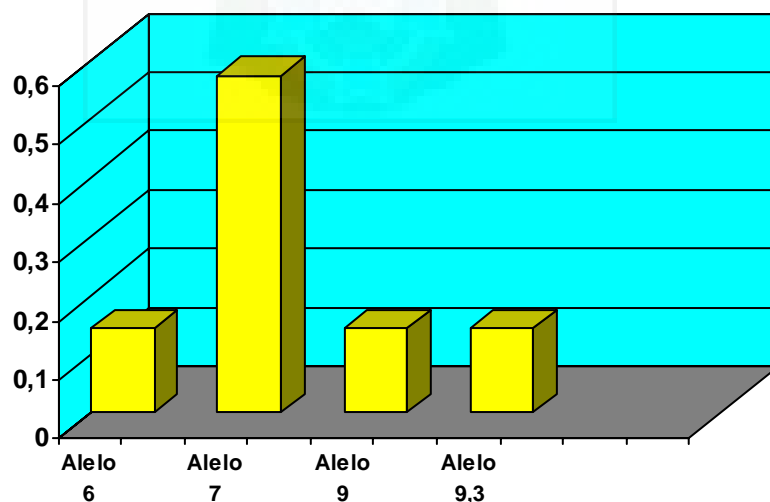


Tabla 8. Frecuencias alélicas del Sistema CTT para el marcador THO1

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	5 (179)	0	0	
	6 (183)	0,143	0,020449	
	7 (187)	0,571	0,326041	
	8 (191)	0	0	
THO1	9 (195)	0,143	0,020449	0,633061
	9.3 ()	0,143	0,020449	
	10 (199)	0	0	
	11 (203)	0	0	
TOTAL		1		

Existe una gran parte de la población que presenta una elevada frecuencia del alelo 7 para el *locus* THO1 cuyo valor es igual a 0,571, como muestra la figura 12 y tabla 8, que como en el anterior caso es poco discriminativa a la hora de efectuar una valoración probabilística, así también para este *locus* o marcador se reportan frecuencias iguales para los alelos 6, 9, y 9,3 mismos que se encuentran equitativamente distribuidos en nuestra población, sobre la cual estos datos nos revelan la presencia de alelos comunes lo que indicaría que la población mestiza de la región andina boliviana no presenta una diversidad génica considerable para este marcador, lo cual se corrobora con el dato obtenido del cálculo de la diversidad génica que es igual a 0,633, que comparando con el caso anterior esta presenta una menor frecuencia. El análisis realizado para este caso se basa en dos posibilidades la primera, que no se haya verificado los niveles de incesto presente en nuestra población y la segunda y la más aceptada se debe a que la cantidad de cromosomas u *locis* analizados son insuficientes para generar una distribución alélica más representativa para el estudio.

Figura 13. Sistema *TPOX*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la región Andina Boliviana

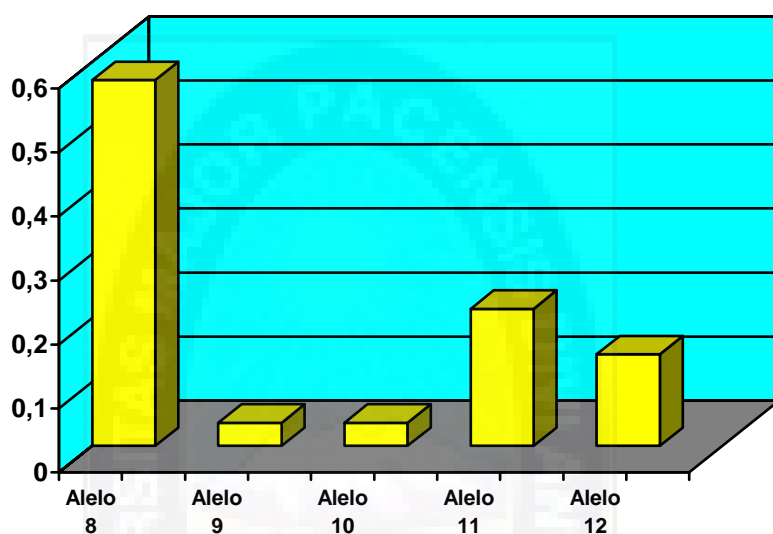


Tabla 9. Frecuencias alélicas del Sistema CTT para el marcador TPOX

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	6 (224)	0	0	
	7 (228)	0	0	
	8 (232)	0,571	0,326041	
	9 (236)	0,036	0,001296	
TPOX	10 (240)	0,036	0,001296	0,606418
	11 (244)	0,214	0,045796	
	12 (248)	0,143	0,020449	
	13 (252)	0	0	
TOTAL		1		

Según los resultados obtenidos para el marcador TPOX en la población mestiza de la región andina boliviana que se indican en la figura 13, tabla 9, revelan que el alelo 8 presenta una frecuencia igual a 0,571 siendo esta la mayor frecuencia reportada para este marcador y una menor que esta representada por alelo 9 y 10 con valores iguales a 0,036, que como en los casos anteriores indicamos que los primeros son poco discriminativos y los últimos de amplia utilidad en la valoración estadística además de ser marcadores propios de nuestra población. Para este caso en especial a diferencia del caso anterior se reporta una diversidad génica mucho menor pese a que las frecuencias alélicas se encuentran bien distribuidas para los alelos posibles de este marcador.

La razón fundamental y que explica estos valores bajos en diversidad génica revelan niveles bajos de Heterozigosidad considerando que la diversidad génica es homóloga en cromosomas autosómicos a lo que representa la Heterozigosidad.

Figura 14. Sistema *F13A01*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

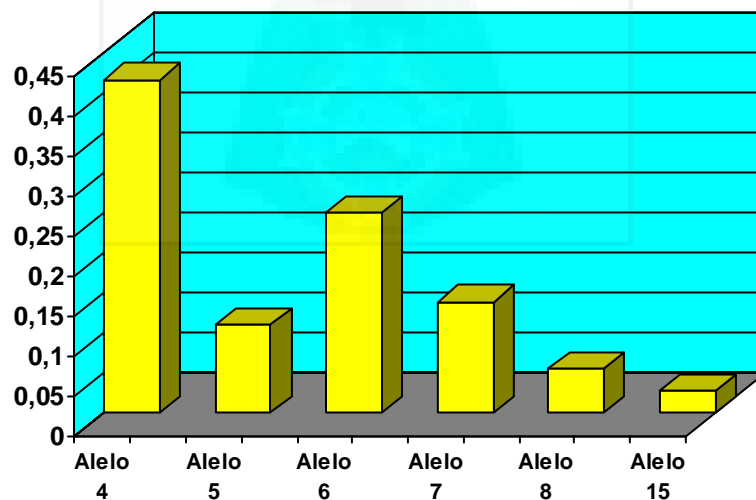


Tabla 10. Frecuencias alélicas del Sistema FFv para el marcador F13A01

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	4 (283)	0,416	0,173056	
	5 (287)	0,111	0,012321	
	6 (291)	0,25	0,0625	
	7 (295)	0,139	0,019321	
	8 (299)	0,056	0,003136	0,728882
F13A01	9 (303)	0	0	
	10 (307)	0	0	
	11 (311)	0	0	
	12 (315)	0	0	
	13 (319)	0	0	
	14 (323)	0	0	
	15 (327)	0,028	0,000784	
	16 (331)	0	0	

Como podemos observar en la figura 14 y tabla 10, el alelo que se presenta una mayor frecuencia es el alelo 4 para el marcador F13A01 que es igual a 0,416, y en menor proporción el alelo 15 igual a 0,028, para este mismo *locus*, cuyos resultados nos indican que el alelo 4 para el marcador F13A01, se encuentra ampliamente distribuido en nuestra población en tal sentido es un marcador poco discriminativo a la hora de realizar un evaluación estadística para la identificación de individuos debido a que su elevada frecuencia es un indicativo de que exista una elevada probabilidad de que este se encuentre en un conjunto elevado de personas en nuestra población. Por el contrario el alelo 15 para este *locus*, al presentar una baja frecuencia en nuestra población nos hace tomarlo como un marcador ideal, el cual es ampliamente discriminativo a la hora de una evaluación estadística debido a que su baja frecuencia es un indicativo de que exista una baja probabilidad de que este se encuentre en nuestra población.

Por otro lado la diversidad genética dada para este marcador igual a 0,728 este valor nos hace pensar que las frecuencias alélicas encontradas para este marcador en nuestra población, se encuentran ampliamente distribuidas y diversificadas con niveles de Heterozigosidad.

Figura 15. Sistema *FESFPS*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

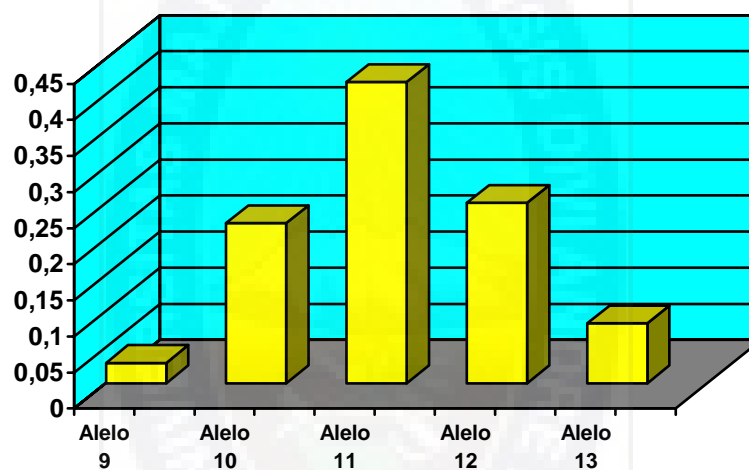


Tabla 11. Frecuencias alélicas del Sistema FFv para el marcador FESFPS

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	7 (222)	0	0	
	8 (226)	0	0	
	9 (230)	0,028	0,000784	
	10 (234)	0,222	0,049284	
FESFPS	11 (238)	0,417	0,173889	0,880
	12 (242)	0,25	0,0625	
	13 (246)	0,083	0,006889	
	14 (250)	0	0	
TOTAL		1		

Haciendo un análisis de los datos obtenidos para el marcador FESFPS encontramos que una gran parte de la población presenta el alelo 11, mismo que a comparación de los demás alelos presenta la frecuencia elevada como se muestra en la figura 15 tabla 11, teniendo un valor igual 0,417; así también encontramos a un alelo poco frecuente en nuestra población como es el alelo 9 cuyo valor es igual a 0,028.

Realizando una evaluación general de las frecuencias que presenta este marcador para los distintos alelos posibles, verificamos notoriamente una amplia distribución alélica por lo tanto un elevado polimorfismo genético en la población en estudio es así que respaldados por la diversidad génica cuyo valor es igual a 0,880, deducimos que los valores reportados son amplia utilidad en el análisis probabilístico en la identificación de individuos además de considerar que nuestra población para este marcador se encuentra en equilibrio génico.

Figura 16. Frecuencias alélicas del Sistema *Vwa* en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

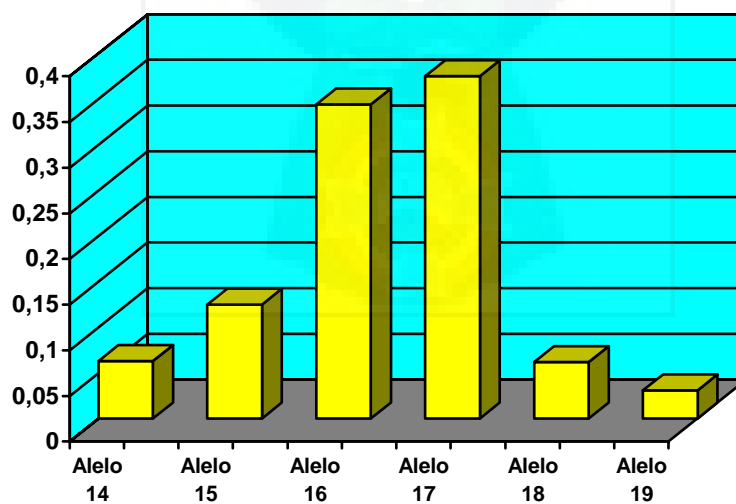


Tabla 12. Frecuencias alélicas del Sistema FFv para el marcador vWA

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	13 (139)	0	0	
	14 (143)	0,063	0,003969	
	15 (147)	0,125	0,015625	
	16 (151)	0,344	0,118336	
Vwa	17 (155)	0,375	0,140625	0,857265
	18 (159)	0,062	0,003844	
	19 (163)	0,031	0,000961	
	20 (167)		0	
TOTAL		1		

Los resultados que se reportan para el marcador vWA, en la figura 16, tabla 12, muestran una amplia distribución alélica en nuestra población tal es el caso que el alelo 17 reporta un valor igual a 0,375 cuyo valor es relativamente mayor pero en menor grado en comparación con las otras frecuencias alélicas que se reportan para este mismo marcador, así mismo el alelo 19 cuyo valor es igual a 0,031 resulta ser la frecuencia mas baja reportada en tal sentido como habíamos mencionado para los anteriores casos este valor es altamente discriminativo a la hora de realizar la valoración de un resultado.

Por otro lado debemos considerar que la diversidad génica dada para este *loci* es la mas elevada en función a los demás marcadores, siendo su valor igual a 0,857 mismo que refleja un parámetro bastante importante a la hora de considerar el equilibrio génico de la población para este marcador.

Figura 17. Sistema *D16S539*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

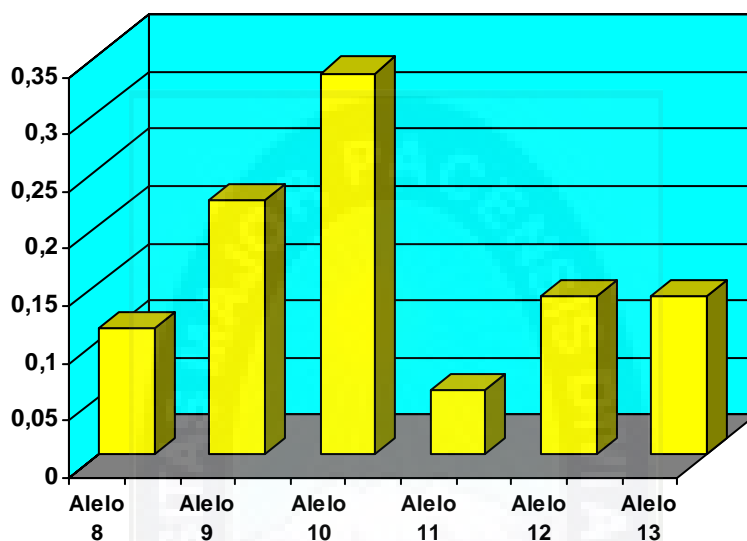


Tabla 13. Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR para el marcador *D16S539*

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	5 (264)	0	0	
	8 8 276	0,111	0,012321	
	9 (280)	0,222	0,049284	
	10 (284)	0,333	0,110889	
D16 S539	11 (288)	0,056	0,003136	0,788864
	12 (292)	0,139	0,019321	
	13 (296)	0,139	0,019321	
	14 (300)	0	0	
	15 (304)	0	0	
TOTAL		1		

Existe una gran parte de la población que presenta una elevada frecuencia del alelo 10 para el marcador D16S539 cuyo valor es igual a 0,333 como muestra la figura 17, tabla 13, así también para este mismo marcador se reportan frecuencias relativamente cercanas debido a los mismos que se encuentran ampliamente distribuidos en nuestra población, pero es de considerar que el alelo 11 reporta un valor igual a 0,056; por lo que dicho alelo podría representar a un alelo propio de nuestra población. Además de presentar una amplia distribución alélica este marcador reporta una diversidad génica igual a 0,788 lo que nos induce pensar que los datos obtenidos son relativamente informativos para nuestros fines.

Figura 18. Sistema *D7S820*; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

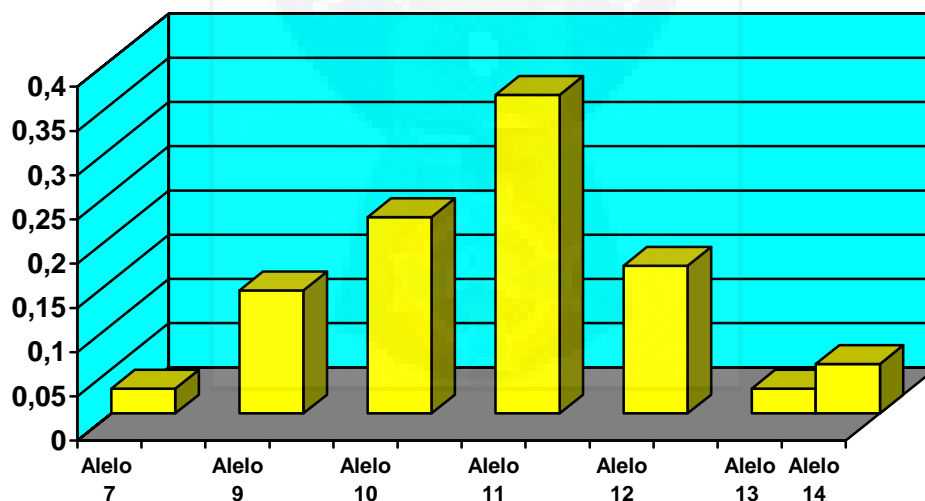


Tabla 14. Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR para el marcador D7S820

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	6 (215)	0	0	
	7 (219)	0,028	0,000784	
	8 (223)	0	0	
	9 (227)	0,139	0,019321	
D7S820	10 (231)	0,222	0,049284	0,818486
	11 (235)	0,36	0,1296	
	12 (239)	0,167	0,027889	
	13 (243)	0,028	0,000784	
	14 (247)	0,056	0,003136	
TOTAL		1		

Según los resultados obtenidos para el marcador D7S820 en la población mestiza de la región andina boliviana que se indican en la figura 18, tabla 14, revelan que el alelo 10 presenta una frecuencia igual a 0,222 siendo esta la mayor frecuencia reportada para este marcador y una menor que esta representada por alelo 7 y 13 con valores iguales a 0,028 , que como en los casos anteriores indicamos que los primeros son poco discriminativos y los últimos de amplia utilidad en la valoración estadística además de ser marcadores propios de nuestra población. Para este caso en especial a diferencia del caso anterior se reporta una diversidad génica mucho mayor debido a que los niveles u casos de Homozigosidad son comparativamente bajos lo que hace suponer que las frecuencias alélicas se encuentran bien distribuidas para los alelos posibles de este marcador.

Figura19. Sistema D13S317; Frecuencias alélicas en población Mestiza de la Región Andina Boliviana

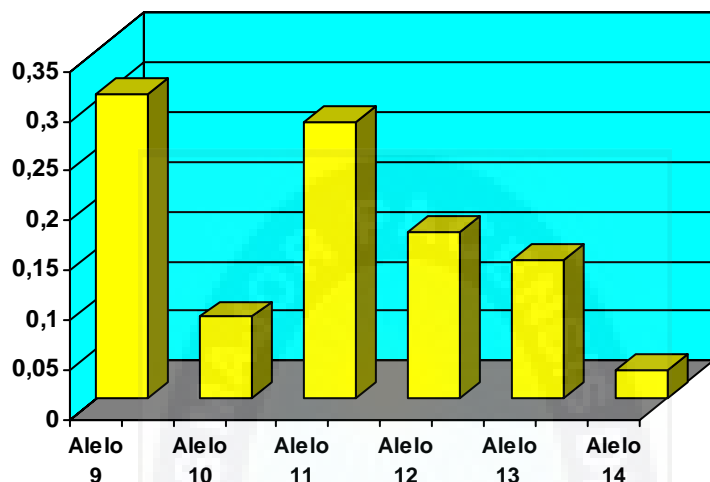


Tabla 15. Frecuencias alélicas del Sistema SILVER STR para el marcador D13S317

Locus	Alelos (pb)	Frecuencia	Frecuencia ²	Diversidad Génica
	7 (165)	0	0	
	8 (169)	0	0	
	9 (173)	0,306	0,093636	
	10 (177)	0,082	0,006724	
D13S317	11 (181)	0,278	0,077284	0,851646
	12 (185)	0,167	0,027889	
	13 (189)	0,139	0,019321	
	14 (193)	0,028	0,000784	
	15 (197)	0	0	
TOTAL		1		

Como se puede observar en la figura 19 y tabla 15, el alelo que se presenta una mayor frecuencia es el alelo 9 para el marcador D13S317 igual a 0,306 y en menor proporción el alelo 14 igual a 0,028; para este mismo *locus*, cuyos resultados nos indican que el alelo 9 para el marcador D13S317 se encuentra ampliamente distribuido en nuestra población en tal sentido es un marcador poco discriminativo

debido a que su elevada frecuencia es un indicativo de que exista una elevada probabilidad de que este alelo se encuentre en un conjunto elevado de personas en nuestra población. Por el contrario el alelo 14 para este *locus*, al presentar una baja frecuencia nos hace tomarlo como un marcador ideal, el cual es ampliamente discriminativo debido a su baja frecuencia. Por otro lado la diversidad genética dada para este marcador igual a 0,851 este valor nos hace pensar que las frecuencias alélicas encontradas para este marcador en nuestra población, se encuentran ampliamente distribuidas y diversificadas en nuestra población con niveles altos de Heterozigosidad y niveles bajos de Homozigosidad.

Tabla 16. BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN POBLACIÓN MESTIZA DE LA REGIÓN ANDINA BOLIVIANA

CSFIPO		THO1		TPOX		D7S820		D16S539		D13S317		F13A01		vWA		FESFPS	
N.al=60		N al =60		N al =60		N.al=60		N.al =60		N.al =60		N.al=60		N.al=60		N.al=60	
Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx	Alelo	Fx
7	0	5	0	6	0	6	0	7	0	7	0	4	0.416	13	0	7	0
8	0	6	0.143	7	0	7	0.028	8	0.111	8	0	5	0.111	14	0.063	8	0
9	0	7	0.571	8	0.571	8	0	9	0.222	9	0.306	6	0.25	15	0.125	9	0.028
10	0,208	8	0	9	0,036	9	0.139	10	0.333	10	0.082	7	0.139	16	0.344	10	0.222
11	0,208	9	0.143	10	0,036	10	0.222	11	0.056	11	0.278	8	0.056	17	0.375	11	0.417
12	0,458	9,3	0.143	11	0,214	11	0.36	12	0.139	12	0.167	9	0	18	0.062	12	0.25
13	0,084	10	0	12	0,143	12	0.167	13	0.139	13	0.139	10	0	19	0.031	13	0.083
14	0,042	11	0	13	0	13	0.028	14	0	14	0.028	11	0	20	0	14	0
						14	0.056			15	0	12	0				
												13	0				
												14	0				
												15	0.028				

Fx%= Porcentaje de Frecuencias alelicas

6.3 ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE ESTADÍSTICOS POBLACIONALES EN POBLACIÓN MESTIZA DE LA REGIÓN ANDINA BOLIVIANA.

Tabla 17. Estadísticos poblacionales de 9 *loci* STR, obtenidos en la Población Mestiza de la Región Andina Boliviana

LOCI STR	CSFIPO	TPOX	THO1	F13A01	FESFPS	VWA	D16S539	D7S820	D13S317
Poder de discriminación	0,819	0,776	0,776	0,864	0,846	0,867	0,901	0,864	0,883
PIC (Índice de polimorfismo)	0,65	0,56	0,57	0,69	0,66	0,67	0,76	0,74	0,74
Poder de exclusión	0,271	0,345	0,345	0,304	0,304	0,622	0,662	0,887	0,773
Índice Típico de Paternidad	1,20	1,40	1,40	1,29	1,29	2,67	3,00	9,00	4,50
Homozigosidad %	41,7%	35,7%	35,7%	38,9%	38,9%	18,8%	16,7%	5,6%	11,1%
Heterozigosidad	58,3%	64,3%	64,3%	61,1%	61,1%	81,3%	83,3%	94,4%	88,9%
Total de alelos	24	28	28	36	36	32	36	36	36

Este estudio a podido generar estadísticos poblacionales tales como el *Poder de discriminación*, que se muestra en la tabla 17, cuyos valores fueron procesados mediante el programa computarizado Powerstat, mismo que reporto un valor igual a 0,901 para el marcador D16S539, siendo este el valor máximo y un valor mínimo igual a 0,776 para los marcadores TPOX y THO1, lo que da a entender que para este parámetro estadístico el marcador D16S539, será de gran ayuda en poder evaluar la diferenciación genética entre individuos mediante el análisis de este marcador así como del conjunto de marcadores genéticos que presentan valores cercanos a este.

Así también consideramos otro parámetro estadístico como es el *Índice de polimorfismo* que como en el caso anterior sus valores son reportados en la tabla 17, donde el marcador TPOX es uno de los que menor índice polimórfico reporta, tomando en cuenta que este estadístico poblacional evalúa la informatividad de un marcador en

una población de acuerdo a las frecuencias de los alelos, haciendo un análisis de los resultados que nos ofrece este parámetro podemos atrevernos a decir que el marcador TPOX y algunos otros, cuyos valores son cercanos al mencionado presentan una baja tasa polimorfismo alélico para nuestra población por lo tanto no estarían cumpliendo con uno de los requisitos indispensables que hace a un marcador idóneo para este tipo de evaluación, por lo que sería indispensable contar con otros marcadores que nos permitan obtener mayores índices polimórficos.

Por otro lado el *Poder de exclusión* que nos ayuda a cuantificar la validez de un sistema genético, es decir mientras mayor sea su valor mayor será su capacidad de exclusión o discriminar u excluir perfiles genéticos entre individuos.

Considerando el caso el marcador D7S820 es uno de los que su poder de exclusión reporta un valor considerablemente elevado igual a 0,887 indica que este *loci* descartará con mayor facilidad una supuesta paternidad de un individuo o conducirá a la exclusión de un sospechoso en nuestra población.

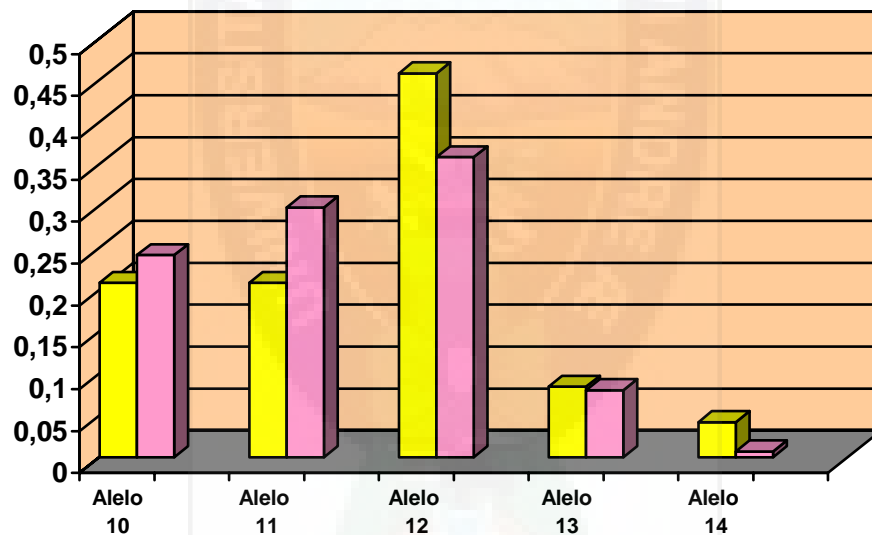
Otro parámetro indicativo de la cuantía del polimorfismo y eficacia de cada marcador genético que pudimos determinar en nuestro estudio son los niveles de Heterozigosidad presentes en nuestra población cuyos valores generados por el sistema u programa powerstat reportan datos relativamente alentadores donde el marcador D7S820 revela un valor de 94,4 % de Heterozigosidad , y en su conjunto la mayoría de los marcadores dan valores de alguna manera son indicativos de que nuestra población se encuentra en equilibrio genético siendo estos datos importantes que representan la variación alélica dentro la población.

Los índices típicos de paternidad que se muestran para los distintos marcadores siendo los mas representativos: el marcador CSF1PO, D16S539 y el D7S820, cuyos valores reportados son : 1.20, 3.00, 9.00 respectivamente, son una clara muestra de la variación que existe entre uno y otro marcador, lo cual se debe casi exclusivamente a

la presencia de alelos raros o poco frecuentes en nuestra población o en el caso donde el índice de paternidad es menor se deduce a que estos alelos son bastante comunes.

6.4 COMPARACIÓN DE LA BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALELICAS EN POBLACIÓN MESTIZA DE LA REGIÓN ANDINA BOLIVIANA CON LA BASE DE DATOS HISPANO AMERICANA

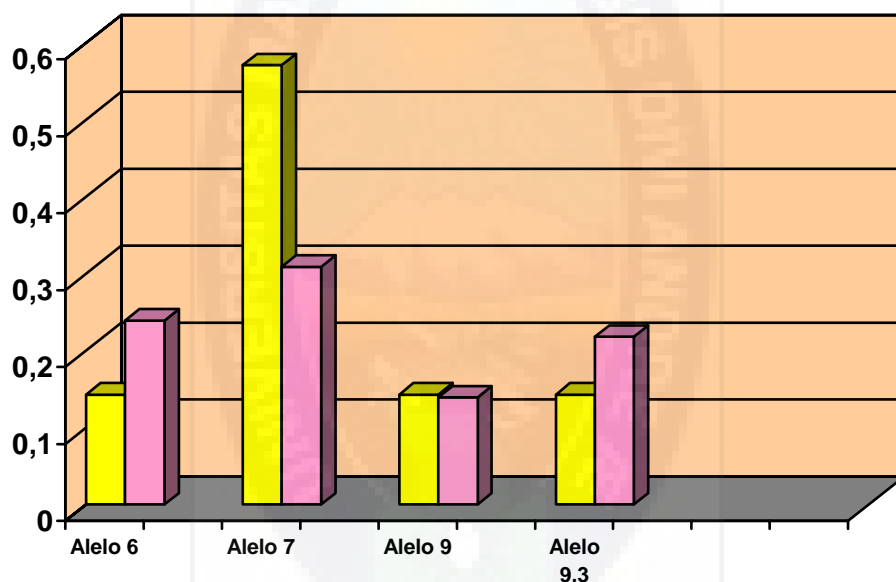
Figura 20. Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema CTT, Marcador *CSF1PO* en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



Realizando una valoración comparativa entre ambas poblaciones se encontró que el alelo mas frecuente para este marcador en nuestra población es el alelo 12, así como los datos reportados para los hispano americanos, siendo sus valores 0.458 y 0,358 respectivamente, lo que indica que este alelo se encuentra ampliamente distribuido presentando una elevada frecuencia en la población hispano americana. Por el contrario los alelos menos frecuentes para ambas poblaciones el aleo 14 cuyos

valores son 0,042 y 0,007 respectivamente, constituyendo estos valores diferencias sutiles e indicando que nuestra población presenta ciertas características hispano americanas.

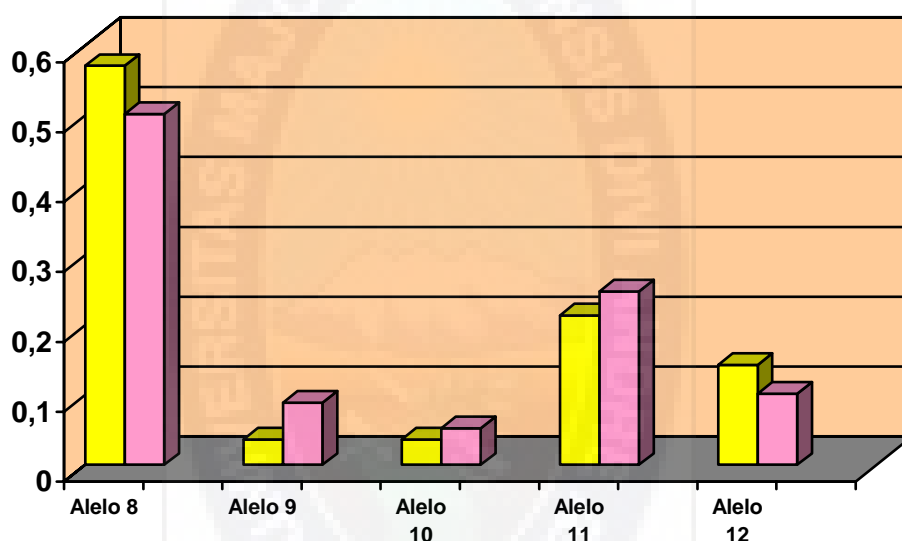
Figura 21. Comparación de las Frecuencias alélicas del Sistema CTT; Marcador THO1 en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



Hemos encontrado 4 alelos en nuestra población mientras que en la población hispano americana se reportan 5 alelos. en ambas el alelo 7 es el más frecuente cuyos valores son: 0,571 en la población mestiza de la región andina boliviana y 0,309 en la hispano americana existiendo diferencias significativas entre estas poblaciones, tomando en cuenta que otros alelos tales como el 6 y el 9,3 se presentan con mayor frecuencia en los hispano americanos, por otro lado el alelo 9 es uno de los pocos cuyo valor es semejante entre ambas lo que indica que gracias a este alelo nuestra

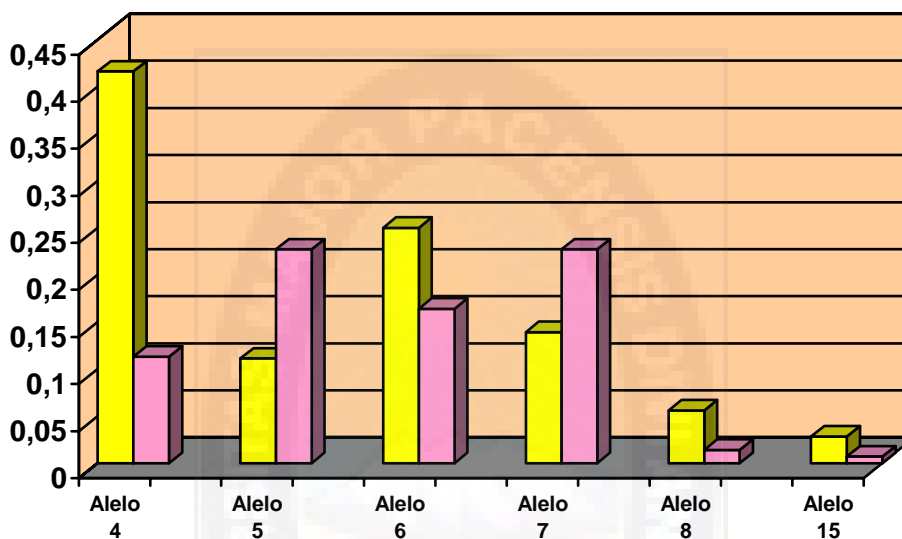
población presenta características similares a la hispano americana, que al igual que el anterior marcador reporta similitudes para algunos determinados alelos.

Figura 22. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema CTT*, *Marcador TPOX* en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



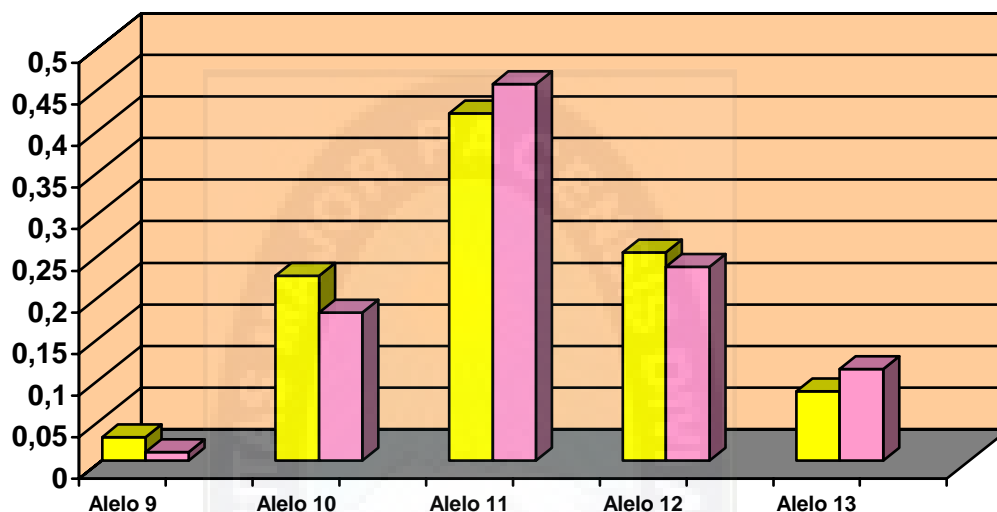
Los datos reportados para el sistema CTT Marcador TPOX referentes a nuestra población y a la población hispano americana, nos indican que la frecuencia mas elevada en ambos casos se da al alelo 8 donde los valores reportados son: 0,571 y 0,502 respectivamente. Pese a la similitud encontrada en este marcador para el alelo 8, debemos considerar los demás que nos indican diferencias significativas para el alelo 9 donde nuestra población reporta un valor igual 0,143 en relación a la otra población igual a 0,089 es así que este alelo, como demuestran los datos es mucho mas frecuente en nuestra población lo que lo hace como en todos los casos mientras mas frecuente sea un alelo dentro un marcador o sistema menor será su poder discriminativo.

Figura 23. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema FFv, Marcador F13A01* en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



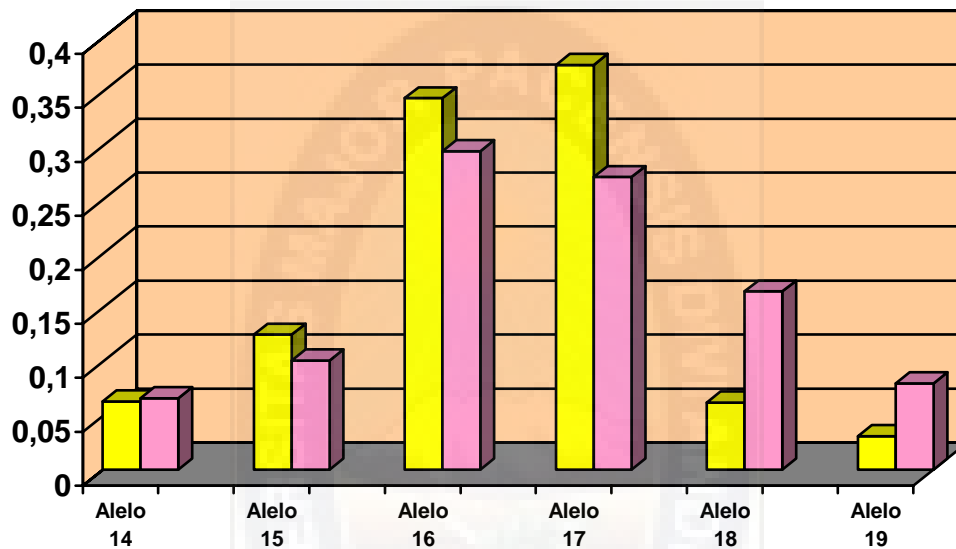
Nuestra casuística esta representada por 6 alelos, en orden de frecuencia el alelo mas común para nuestra población es el alelo 4 cuya frecuencia es igual a 0.416, en cambio para la población hispano americana los alelos mas comunes son el alelo 5 y 7 con una frecuencia de 0,227 en ambos casos, resulta llamativo este hecho debido que en los anteriores casos de alguna u otra manera existía cierta similitud en lo que respecta al alelo mas común habiendo tenido diferencias sutiles, en este caso escapa a la coincidencia anteriormente dada lo que llama la atención por que el hecho de utilizar la base de datos de frecuencias hispano americanas para la valoración probabilística en la identificación de individuos para algún caso este incrementaría el índice de paternidad o en su defecto al utilizar nuestra base de datos disminuiría dicho índice. Además debemos considerar que el alelo 15 en ambas poblaciones, presenta frecuencias bajas por lo que dicho alelo para este marcador es altamente discriminativo en este caso en la población hispano americana en relación a la nuestra.

Figura 24. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema FFv*, *Marcador FESFPS* en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



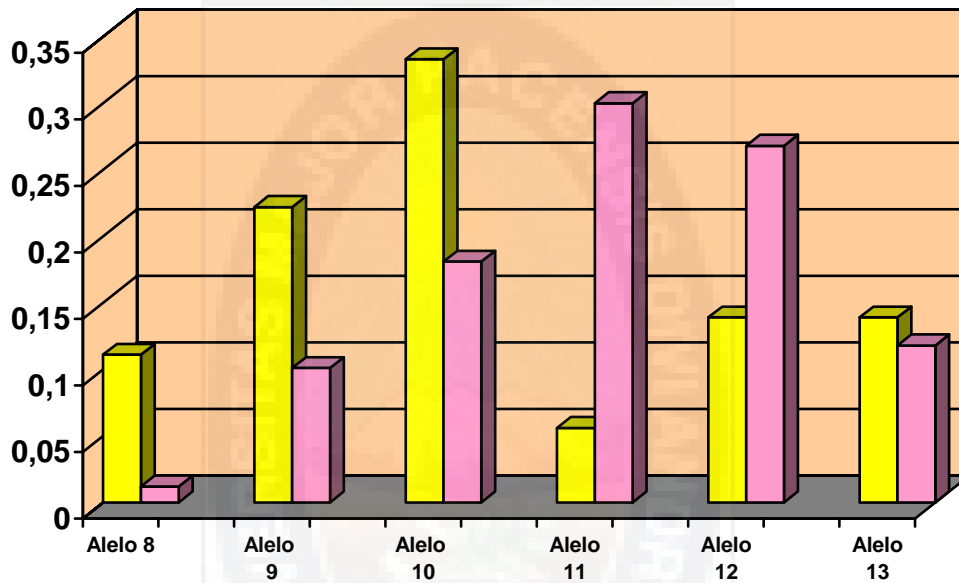
Realizando una valoración comparativa entre ambas poblaciones se encontró que el alelo mas frecuente para este marcador en nuestra población es el alelo 11, así como los datos reportados para los hispano americanos, siendo sus valores 0,417 y 0,452 respectivamente, lo que indica que este alelo se encuentra ampliamente distribuido presentando una elevada frecuencia en la población hispano americana. Por el contrario los alelos menos frecuentes para ambas poblaciones el aleo 9 cuyos valores son 0,028 y 0,010 respectivamente, constituyendo estos valores diferencias sutiles e indicando que nuestra población presenta ciertas características hispano americanas.

Figura 25. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema FFv, Marcador vWA*, en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



Los datos reportados para el sistema FFv Marcador vWA referentes a nuestra población y a la población hispano americana, nos indican que la frecuencia más elevada en ambos casos se da a los alelos 16, 17 donde los valores reportados son: 0,344; 0,295 y 0,375; 0,271 respectivamente. Pese a la similitud encontrada en este marcador para el alelo 16, 17, debemos considerar los demás, como el alelo 18 donde la frecuencia para la población hispano americana es superior en relación a la nuestra 0,165 y 0,062 respectivamente, por lo que este alelo para el marcador vWA es altamente informativo y concluyente a la hora de hacer el análisis estadística.

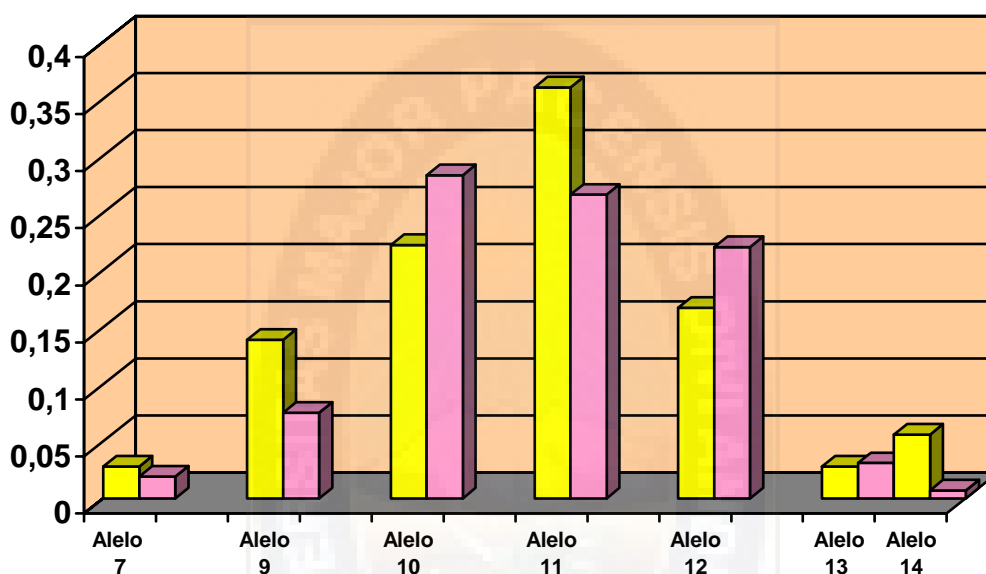
Figura 26. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema SILVER STR, Marcador D16S539* en población Mestiza de la Región Andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



Según los datos reportados para este marcador tenemos que el alelo mas frecuente en nuestra población es el alelo 10 con una frecuencia igual a 0,333; en cambio la población hispano americana presenta sus alelos comunes con una frecuencia de 0.300 para el alelo 11 y 0,268 para el alelo 12.

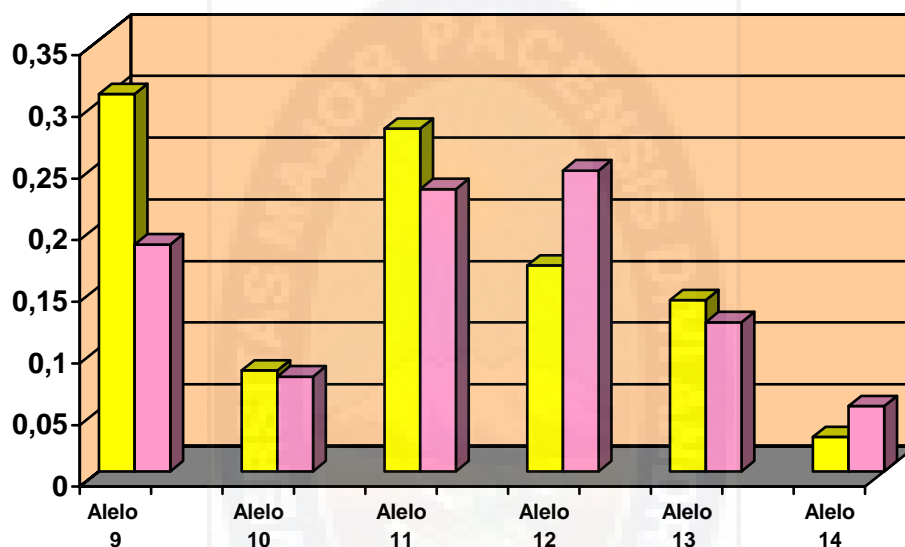
El dato mas interesante que se genera en base esta comparación esta en función al alelo 11 donde nuestra población reporta el dato o frecuencia mas baja y para el mismo alelo la población hispano americana reporta su mayor frecuencia, lo que es un indicativo una ves mas de que nuestra población presenta. Por lo que nuestra población comparte un bajo nivel de características hispano americanas.

Figura 27. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema SILVER STR*, *Marcador D7S820*, en población Mestiza de la Región andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



Nuestra casuística está representada por 7 alelos, en orden de frecuencia el alelo más común para nuestra población es el alelo 11 cuya frecuencia es igual a 0,36; en cambio para la población hispano americana los alelos más comunes son el alelo 10 y 11 con una frecuencia de 0,283 y 0,266. Resulta bastante llamativo el hecho de que en el mayor de los casos y en función a los alelos se reportan frecuencias alélicas muy bien distribuidas, si bien es cierto que existen diferencias pero estas no son bastante marcadas como en los casos anteriormente analizados. Así también debemos considerar que el alelo 14 para nuestra población reporta un valor igual a 0,056 cuyo valor es relativamente elevado en relación a otras poblaciones, considerando que para el mismo alelo en los hispano americanos reporta un valor sumamente bajo por lo que sería interesante hacer un análisis antropológico y así hacer una valoración con respecto a por qué este alelo circula con mayor frecuencia en nuestra población.

Figura 28. Comparación de las Frecuencias alélicas del *Sistema SILVER STR*, Marcador *D13S317* en población Mestiza de la región andina Boliviana con la base de datos de la población Hispano Americana.



Realizando una valoración comparativa entre ambas poblaciones se encontró que el alelo más frecuente para este marcador en nuestra población es el alelo 9 cuyo valor es igual a 0,306, y los más comunes los hispano americanos el alelo 11 y 12, siendo sus valores 0,229 y 0,244 respectivamente, haciendo un análisis con respecto a los demás alelos coincidimos en indicar que su distribución alélica se encuentra ampliamente distribuido. Por el contrario los alelos menos frecuentes para ambas poblaciones el alelo 14 cuyos valores son 0,028 y 0,053 respectivamente, constituyendo estos valores diferencias sutiles e indicando que nuestra población presenta ciertas características hispano americanas.

6.5 ANALISIS Y OBTENCION DE BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALELICAS DEL SISTEMA HLA CLASE I Y CLASE II EN POBLACION MESTIZA DE LA REGION ANDINA BOLIVIANA.

HLA-A (Clase I)

Se identificaron 7 alelos HLA-A. Los alelos A2 y A28, tenían una frecuencia de 35,4% y 24,4% respectivamente. Los alelos A1, A3 y A29 con una frecuencia del 8,6%; 6,40% y 8,6% respectivamente eran los menos frecuentes (Figura 29).

Los alelos HLA-A más frecuentes dentro de los caucásicos son A2 (27.12%) y A24 (9.56%) lo cual se confirma con los resultados obtenidos en el presente estudio; los japoneses tienen una alta frecuencia alélica en A24 lo que no significa que haya una influencia marcada de este grupo racial ya que al observar las frecuencias alelicas de otros HLA-A no coinciden con las frecuencias observadas. Aunque A1 y A3 tiene una frecuencia relativamente baja, al compararlas con los porcentajes obtenidos.

Figura 29. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-A de la población

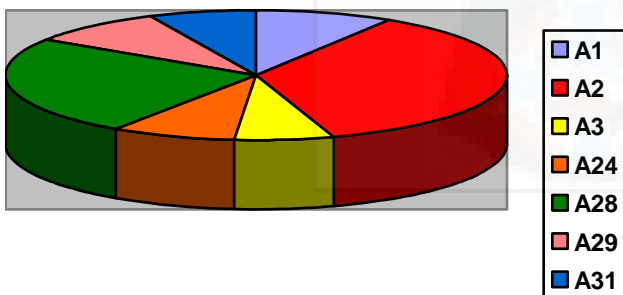


Tabla 18. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-A de la población

ALELO	FRECUENCIA ALELICA %
A1	8.6
A2	35.4
A3	6.4
A24	7.8
A28	24.4
A29	8.6
A31	6.8
TOTAL	100

HLA-B (Clase HLA-B (Clase I))

En cuanto al sistema HLA-B se encontraron 10 alelos. Los alelos B51 y B35 presentaron unas frecuencias del 17.32% y 21.24 % respectivamente. Dentro de los menos frecuentes se hallaron los alelos B37, B39, B40, B48, B50, B62, con una frecuencia entre 0,65 % y 6,53 %; el resto de alelos se ubicaron entre el 13,07% y el 17,32% (Tabla 19).

Por la baja frecuencia que muestran la mayoría de los alelos HLA-B excepto B35 y B51, observando que hay un gran polimorfismo en esta región del CMH, se deduce que en la población estudiada hay un bajo componente negroide.

Figura 30. Frecuencias alélicas de los alelos del HLA-B en la población

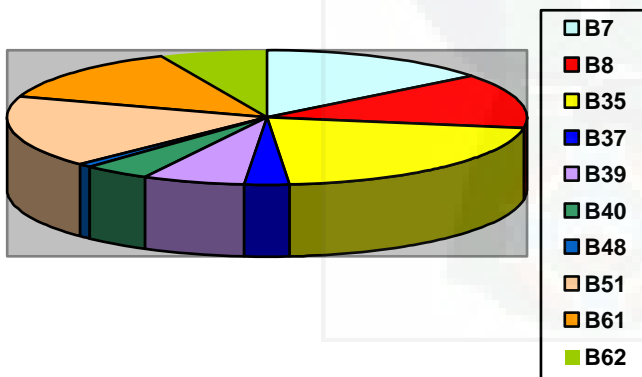


Tabla 19. Frecuencias alélicas de los alelos del HLA-B en la población

ALELO	FRECUENCIA RELATIVA DEL ALELO (%)
B7	14.3
B8	13.1
B35	21.2
B37	2.6
B39	6.5
B40	4.2
B48	0.65
B51	17.3
B61	13.4
B62	6.6
TOTAL	100.00

HLA-C (Clase I)

Para los genes de este sistema se determinaron 7 alelos. Los alelos Cw3 y Cw4 con una frecuencia del 18,2% y 43,0%, fueron los más frecuentes; Cw5 con un 8,6% y Cw7 con un 9,4% también presentaron una frecuencia notoria.

En el reporte antropológico los alelos Cw7 y Cw4 son los más frecuentes dentro de la población hispano americana y pertenecen a un modelo mestizo típico, además Cw5 presenta un incremento dentro de su frecuencia para esta misma población, por lo cual se deduce que la población estudiada al presentar una frecuencia alelica bastante alta en estos dos alelos tiene un alto componente hispano americano.

Figura 31. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-C de la población estudiada.

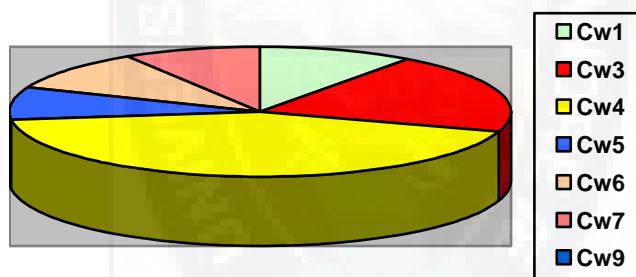


Tabla 20. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-C de la población estudiada.

Alelo	Cw1	Cw3	Cw4	Cw5	Cw6	Cw7	Cw9
Frec. alel.	10.4	18.2	43.0	8.6	10.4	9.4	0

HLA-DR (Clase II)

Se determinaron 11 alelos de este sistema. Los alelos DR2, DR3, DR4 y DR9 mostraron una frecuencia del 14,4%; 25,0%; 19% y 12,4% respectivamente. Los otros alelos presentaron frecuencias entre el 0 % y 9,4% (Figura 32).

En el reporte antropológico se muestra que la población hispano americana presenta una alta frecuencia de DR4, DR7 y DR9; lo cual concuerda con algunos de nuestros alelos estudiados con lo que se demuestra que la población estudiada, presenta cierta relación con las frecuencias reportadas para los hispano americanos aunque DR9 no presenta una frecuencia alta.

Figura 32. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DR de la población estudiada.

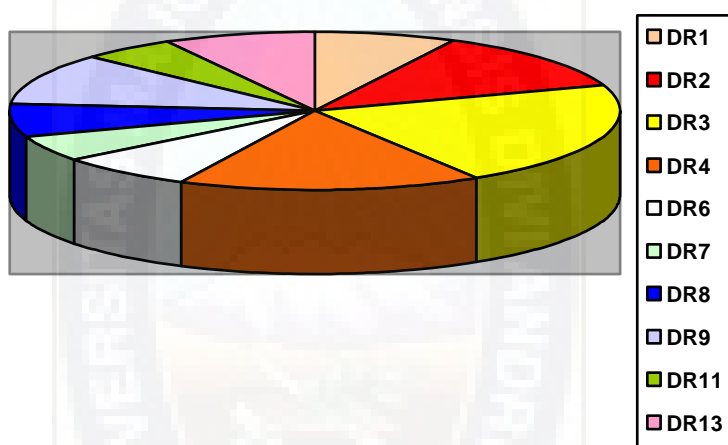


Tabla 21. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DR de la población estudiada.

Alelo	DR1	DR2	DR3	DR4	DR6	DR7	DR8	DR9	DR11	DR13
Frec.alel.	9	14,4	25	19	8.8	6	8	12,4	6	9.4

HLA-DQ (Clase II)

Se detectaron 5 alelos. Los alelos DQ1, DQ2 obtuvieron una frecuencia del 25%, y 25% respectivamente; el alelo DQ4 fue el menos frecuente con un 14 (Figura 33).

De estos alelos no se encuentra mucha información acerca del predominio en hispano americanos, pero sí sobre los predominantes en asiáticos, negroides y orientales; dentro de los cuales están DQ1, DQ3, DQ8 y DQ9, según estudios de poblaciones se

demuestra que en los caucásicos los alelos más frecuentes son DQ2, DQ4, DQ5 y DQ7, los cuales de acuerdo a estudios previos sobre otros componentes genéticos de la raza humana se encuentran ausentes o en baja frecuencia en nuestra población.

Figura 33. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DQ

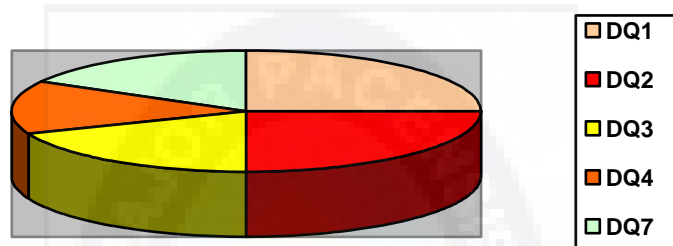


Tabla 22. Frecuencias genéticas de los alelos del HLA-DQ

Alelo	DQ1	DQ2	DQ3	DQ4	DQ7
Frec.alel.	25	25	19	14	17

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se observa que el desequilibrio de ligamiento es un valor poco aceptable dentro de la población en los haplotipos poco comunes ya que la frecuencia haplotípica y el valor de desequilibrio de ligamiento son muy parecidos en algunos haplotipos, pues según estudios previos estos haplotipos y alelos son muy comunes en poblaciones negroides y orientales.

Estudios previos también demuestran que el haplotipo A2/B35, dentro de los HLA clase I, es el haplotipos más frecuentes y por lo tanto, en el estudio presentan un alto desequilibrio de ligamiento, Los demás haplotipos HLA clase I se encuentran dentro

de un rango de desequilibrio de ligamiento aceptable y por lo tanto la población estudiada se encuentra en equilibrio genético

Para los alelos de HLA clase II el desequilibrio de ligamiento es bastante estable y se observa que los haplotipos más frecuentes son DR4/DQ4 y DR7/DQ2, seguidos por DR3/DQ7. DR7/DQ2, de acuerdo al reporte antropológico, se encuentra como uno de los más comunes; por lo cual se deduce que la población estudiada tiene un alto componente hispano americano. En cuanto a la distribución de Chi cuadrado para HLA clase I se muestra que hay ocho valores dentro de los haplotipos HLA-A y HLA-B que con un límite de confianza de 0,05 y 7gl (grados de libertad), no entran dentro de la zona de aceptación de la prueba ya que su frecuencia alélica es demasiado baja y presentan una diferencia poco notoria con la frecuencia haplotípica en el valor del desequilibrio de ligamiento. Estos resultados indican que estos haplotipos son relativamente significativos dentro de la población estudiada.

La distribución chi cuadrado para HLA clase II muestra que no hay haplotipos que no estén dentro de la zona de rechazo de la prueba la cual se trabajó con un límite de confianza de 0,05 y 2gl (grados de libertad). Estos resultados indican que el desequilibrio de ligamiento al ser alto en los haplotipos representa el equilibrio genético que tiene la población estudiada en cuanto a HLA clase II.

Tabla 23. Resultados del desequilibrio de ligamiento y Chi cuadrado.

HAPLOTIPO	FA %	LD %	χ^2
A1/B8	0.5	6.100	21.21873
A2/B35	3.4	10.400	0.87670
A2/B7	1.4	0.300	0.00442
A2/B51	1.7	2.000	0.13440
A2/B39	0.7	1.000	0.39785
A3/B7	0.4	4.300	11.41512
A3/B51	0.5	1.000	0.42219
A24/B7	1.0	0.700	0.05142
A24/B35	2.3	2.100	0.07634
A24/B61	0.9	4.300	2.27338
DR1/DQ5	1.2	1.300	0.09787
DR2/DQ5	2.9	3.400	0.09800
DR3/DQ2	2.9	6.200	0.33565
DR3/DQ7	3.1	7.400	0.51058
DR3/DQ4	2.6	1.300	0.01932
DR4/DQ4	4.8	15.00	0.70780
DR4/DQ7	3.1	0.500	0.00193
DR7/DQ2	4.2	12.900	0.70039

VII. CONCLUSIONES

1. El presente estudio ha permitido crear una base de datos de frecuencias alélicas de los 9 *loci* STR analizados en Población Mestiza de la región andina Boliviana, misma que será una base de datos de referencia y orientación, cuyos valores podrán ser utilizados en la valoración estadística de la determinación de vínculos biológicos y la identificación de individuos.
2. El presente estudio ha permitido crear una base de datos de frecuencias alélicas del sistema HLA Clase I y II, analizados en Población Mestiza de la región andina Boliviana, que actualmente en relación a la base de datos obtenida a partir de marcadores tales como los STR estas se hacen poco útiles o casi nulas en la identificación de individuos, enmarcándose su utilidad direccional al trasplante de órganos.
3. Según los resultados obtenidos pudimos detectar la Frecuencia con que aparecen los diferentes alelos de los 9 STR (Sistemas de Microsatélites) estudiados individualmente: CSF1PO; TPOX; THO1; F13AO1; FESFPS; vWA; D16S359; D7S820 y D13S317, así como también la variabilidad de los mismos en la Población Mestiza de la región andina Boliviana. Existen alelos ya identificados en otras poblaciones que no aparecen en esta; tampoco han sido observados alelos raros, es decir aquellos alelos aún no descritos en la bibliografía.
4. La determinación de las Frecuencias con que aparecen los diferentes alelos del Sistema HLA Clase I y Clase II estudiados individualmente: Clase I "A; B, Cw" Clase II " DR y DQ", y sus subtipos , así como también la variabilidad de los mismos en la Población Mestiza de la región andina

Boliviana. Determinando que existen alelos ya identificados en otras poblaciones que no aparecen en esta; tampoco han sido observados alelos raros.

5. Haciendo una valoración de los estadísticos Poblacionales encontrados se ha detectado una moderada Heterozigosidad (58,3 - 64,3%) para los marcadores CSIPO, TPOX, THO1, F13A01, FESFPS y para los demás marcadores (81,1 - 94,4%) y un gran número de genotipos con cada marcador analizado; lo cual nos permite inferir que podrían ser utilizados para aplicación en el Campo Forense en nuestro país. También en base a eso se puede deducir su poder discriminativo es decir si podrían o no ser orientadores al ser utilizados como indicadores de identidad.
6. Los resultados de las frecuencias obtenidos señalan que estos Marcadores Genéticos; principalmente al ser empleados de manera combinada (Regla del producto de las frecuencias genotípicas), pueden dar una probabilidad cada vez mayor de la identidad de la muestra en análisis y no de cualquier otra al azar en la población; obteniéndose así un alto grado de certeza, útil para aplicarlo al Campo Forense.
7. Luego de realizar una comparación entre nuestra población y la hispano americana concluimos diciendo que existe cierto grado de variabilidad en las bases de datos que se reportan para cada País, en el sentido que algunos de los alelos que son bastante comunes en la población hispano americana mismos son poco frecuentes en nuestra población, o a la inversa lo que llevaría a cometer un problema intrínseco a la hora de efectuar la valoración probabilística.

8. Entre los factores principales que inciden en la cierta similitud pero no igualdad de las frecuencias alélicas entre nuestra población y la hispano americana, se debe principalmente a la migración baja pero marcada que existe en nuestro medio y al alto grado de mestizaje presente en nuestra población.



VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar el análisis de una mayor cantidad de muestras e incluirlas en esta base de datos con el único objetivo de generar resultados cuyo valor sea altamente significativo a la hora de presentarlo como una evidencia ante el ente judicial.
2. Incrementar el número de marcadores STR al set inicial de los 9 *loci* analizados, para así poder llegar a reportar resultados altamente concluyentes y que no presten a ningún tipo de subjetividades alcanzando índices de paternidad igual o mayores al 99.99999999%, e índices de incriminación considerablemente altos.
3. Estratificar los estudios de cromosomas autonómicos a estudios de cromosoma Y e incluso ADN mitocondrial con fines Antropogenéticos determinando el grado de migración y la determinación de patrones genéticos vírgenes que no formaron parte del mestizaje, considerando que Bolivia es un país pluricultural y extremadamente diverso.
4. Considerando que los niveles de criminalidad en nuestro medio se incrementan a un ritmo sumamente asombroso, el Gobierno junto al Ministerio público y los medios idóneos, deben generar políticas de estado frente a estos hechos, velando por la integridad de los ciudadanos.
5. Desarrollar Proyectos y Programas Institucionales a nivel nacional e internacional con la finalidad de captar recursos que permitan el uso de esta herramienta, reduciendo gastos y así facilitando el acceso a la misma, tomando en cuenta que muchos casos de hecho criminal quedan sin

resolver tan solo por un problema económico, o en otro ámbito, hijos que quedan desprotegidos por el padre, por no tener suficientes pruebas que acrediten la paternidad.

6. Educar y asesorar al ente judicial sobre el manejo y las virtudes que representa el utilizar esta herramienta, como un método identificatorio, constituyéndose como un medio de prueba infalible a la hora de determinar vínculos familiares o la incriminación de una persona en un hecho criminal.



IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **ALVAREZ A.** Validación de la Prueba del ADN: La Prueba del ADN en Medicina Forense. Cap 25 Edl Masson 1.999.pp 85-88
2. **ARIAS A.** Rada A. Aguilar X; Primer perfil obtenido en el Instituto de Genética para *loci* de STR de acuerdo a normas del CODIS y GITAD para identificación de individuos. Cuadernos del Hospital de Clínicas cartas al editor, 2001; pp 47, 147.
3. **BEATIE E,** Davies K, Maddow JF, Kappes SW et al. (1995). An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, 140: pp 703-724.
4. **BENECKE, M.,** Schmitt, C., Staak, M., in: Proceedings of the First European Symposium on Human Identification, Toulouse, 29–31 May 1996. Madison: Promega Corporation 1997, p148
5. **BILLE T.;** ADN analysis a powerful Investigative tool. "Profiles in ADN "1999; pp:8-9
6. **BRICEÑO I.,** Bernal J.E. *et al*, 1993, *HLA antigens in Amerindian groups of two different linguistic families*, *European Journal of Immunogenetics* 23:pp 1934-1938.
7. **BUDOWLE B. ;** Giusti, A.M.; Wayne, J.S., F.S.,Fourney, R.M., et al. Fixed Bin analysis for Statistical Evaluation of Continuous Distributions of Allelic Data from Use in Forensic Comparisons. *American Journal of Human Genetics*,in press.
8. **CÉSPEDES S. ;** Impresiones Digitales del "AND" Prueba que Determina la Paternidad. 1994 La Paz - Bolivia: pp 9 - 36
9. **CARRACEDO A. ,** Rodriguez Clavo MS, Pestoni C, Lareu MV, Bellas S, Salas A. Standardization of forensic ADN analysis in Europe. *Forensic Sci Int* 1997: pp 86:87-102.

10. **CARRACEDO A.** , Rodriguez Clavo MS, Pestoni C, Lareu MV, Bellas S, Salas A. Standardization of forensic ADN analysis in Europe. *Forensic Sci Int* 1997:pp 86:87.
11. **CÓDIGO DE FAMILIA**, de la República de Bolivia, 1999, Edit.UPS.pp47-48.
12. **CÓDIGO NIÑO, NIÑA Y ADOLECENTE**, de la República de Bolivia,1999, Edit.UPS.pp 46-48.
13. **CÓDIGO PENAL**, de la República de Bolivia, 2004, Edit.UPS. pp 81-86.
14. **CORACH, D.**, Penacino, G.A. and Sala, A.A. (1994a). Cadaveric ADN Extraction Protocol Based on Cetyl Trymethyl Amonium Bromide (CTAB). *Acta Medicinae Legalis XLIV*: pp 35-36. www.phls.co.uk/facts/Genome/adn-inf.htm
15. **CORACH, D.**; Penacino, G.; Guinther, Ch.; Just, J. and Sotelo, A. (1994b) Dealing With Human Remains Sampled in Disaster Areas: The Case of the Israeli Embassy Explosion Occured in Buenos Aires. *Adv. in For. Haem. 5*: pp 259-261. www.phls.co.uk/facts/Genome/adn-inf.htm
16. **CORACH, D.** ; Sala, A; Penacino, G. and Sotelo, A. (1996) Mass disasters: rapid molecular screening of human remains by means of STR typing. *Electrophoresis 16*: pp 1617-1623. www.phls.co.uk/facts/Genome/adn-inf.htm
17. **CORACH, D.**; Sala, A; Penacino, G.; Iannucci, N; Bernardi, P; Dorettir, M; Fondebrider, L; Ginarte, A; Inchaurregui, A; Olmo, D; Somigliana, C; Turner, S and Hagelberg E (1997) Additional approaches to ADN typing of skeletal remains: the search of "missing" persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis (in press)*. www.phls.co.uk/facts/Genome/adn-inf.htm
18. **CRAWFORD A**, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, Garmonsway HG, ADN Advisory Board: Statistical and population genetics issues affecting the evaluation of the frequency of Occurrence of ADN profiles calculated from pertinent population data base 2000, pp 2-3.

19. **EDWARDS, A.**; Civitello, A.; Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991). ADN typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49: pp 746-756.
20. **EVETT I.** Weir B. Interpreting ADN Evidence. *Statistical Genetics for Forensic Scientists.* Sinauer Associates, INC. Sunderland, MA. USA. 1998. Evidence. *J. Forensic Ident.* (1991) 41: pp 344-356.
21. **FBI ACADEMY** (1989). Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of ADN Analysis. Quantico, Virginia, June, pp 19-23.
22. **GEP-ISFG.** Guía para implantar un sistema de calidad en los Laboratorios de Genética Forense. www.gep-isfg.org
23. **GILL P.** "ADN typing". En; KENDREWJ. *The encyclopedia of Molecular Biology.* Ed. Blackwell Science .Oxford.1998.
24. **GISBERT CALABUIG, J.A.** Aplicaciones del Acido Desoxirribonucléico (ADN) en Medicina Legal - *Medicina Legal y Toxicología.* 1991; 92: pp 1044-5.
25. **HAMMER M.** *et al*, 1999, *Genetic Clues Revise view of Japanese roots*, *Science* 283: pp 1427.
26. **HOST LABORATORY DIVISIÓN FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION.** A Statistical approach for VNTR Analysis. Proceedings of de International Simposium of the Forensic Aspect of ADN Analysis. 1989; 1: pp 121-126.
27. **HURLES M.,** Irven C. *et al*, 1998, *European Y-chromosomal lineages in polynesians: A contrast to the population structure revealed by mtADN*, *American Journal of Human Genetics* 63: pp 1793-1806.
28. **JEFFREYS A.** WilsonV. Thein. 1985. Hipervariable "minisatellite" regions in human ADN. *Nature* 314: pp 542-544
29. **KARAFET T.,** De Knijff P., Wood E. *et al*, 1998, Different patterns of variants of the X and Y-chromosome linked microsatellite *loci* DXYS156X and DXYS156Y in humam population, *Biology* .

30. **KIRBY L.** ADN fingerprinting. Ed. M. Stockton Press. New York 1990, p365.
31. **KIRBY, L.** Genetic principles. ADN Fingerprinting: An Introduction. 1992; pp2:7-
32. **LEE, H.** et al.: Guidelines for the Colletion and Preservation of ADN
33. **LEY ORGÁNICA DEL MINISTERIO PÚBLICO, DE LA REPÚBLICA DE BOLIVIA**, 2004, Edit.UPS. pp 33.
34. **LORENTE A, E.** Villanueva Cañadas. Cuadernos de Medicina Forense, nº 3, enero 1996.
35. **LORENTE, J,** Lorente, M.: Recogida y envío de muestras al laboratorio. En “El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica”. Ed. Comares. (1995) pp:127-172
36. **LUIS H.;** Archivo de Identificacion Genetica Criminal Ministerio de Relaciones Exteriores2001 Vol. 2 N° 16,pp 20-23
37. **MANUAL ESTADÍSTICA APLICADA A LA GENÉTICA FORENSE.** Curso dictado en Caracas, Venezuela. Noviembre 2002.
38. **MANUAL PATCAN**, Versión 1.0. zarrabet@unican.es o riancho@unican.es.
39. **MARTA O., L.** Alcaraz: *Perfil Genómico de la Población Paraguaya* Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, Laboratorio Forense, Policía Nacional, Paraguay, Ciencia y Tecnología 2001 Vol. 1 No. 3 pp 77-80.
40. **NAKAMURA Y.,** Leppert N.,O'Connell P.,Wolf R., Holm T.,Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E. and White R. (1987) Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. Science 237: pp 1616-1622.
41. **NUEVO CÓDIGO DE PROCEDIMIENTO PENAL, DE LA REPÚBLICA DE BOLIVIA**, 1999, Edit.UPS. pp 25- 69.
42. **OSAMU O.** et al : Análisis of Short Tándem Repeat (STR),Polymorphisms by The Powerplex 16 System and capillary Electrophoresis Aplication to Forensic Practice, Acta med. 2003, vol 57, No.2 pp 59-71.

43. **PENACINO, G.**, Corach, D. (1993) "Identificación Post-Mortem de Individuos Mediante Tipificación de ADN: Estrategias Generales de Aplicación Forense". XXIX Reunión Anual de SAIB. Villa Carlos Paz, Córdoba, 17-21 de noviembre de 1993. <http://ebro.unizar.es/uz/forense/pericial.html>
44. **PENACINO, G.**, Sala, A. and Corach, D. (1994). "Post Mortem Molecular Identification. Biological kinship Established by ADN Analysis". ADVANCES IN FORENSIC HAEMOGENETICS 5. Springer- Verlag. pp. 289-291.
45. **PROMEGA .II** Latin American Symposium of Human Identification. Profiles in ADN 1999, pp 3, 12.
46. **PROMEGA:** Genetic Identity Referente Information Population Estatistics Brazilian Population data 1 http://www.promega.com/aplicaciones/hmnid/reference_information/popslat/brazilianstat.
47. **ROBERTIS, E.** Biología Celular y Molecular. Ed.10. el Ateneo. 1981.
48. **SEXOLOGÍA Y LESIONOLOGÍA FORENSE.**
<http://www.segegob.cl/justicia/lesionologia.html>
49. **SWGDM, FBI.** Short Tandem Repeat (STR) interpretation guidelines FBI.UDJ forensic Science Communications .2000, pp 2-3.
50. **WONG, Z.;** Wilson, V.; Patel, I.; Povey, S. and Jeffreys, A. J. (1987). Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human ADN. Ann. Hum. Genet. 51:pp 269-288.
51. **WYMAN A.** White R. A highly polymorphic *locus* in human ADN.Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: pp 54-58
52. **XIANG H.**, Tai S.L., Karenda F. N. Wang J. Deduction of paternity index from ADN mixture. Forensic Science International 128 (2002),pp 105-107.
53. **YOSORIO L.** Manual de Procedimiento del Sistema de Cadena de Custodia: Fiscalía General de la Nación .Bogota Colombia, pp 4-49

ANEXO 1



Microcentrífuga Eppendorf 5414 C



Transiluminador de luz UV

ANEXO 2



Termociclador Perkin Elmer GeneAMP.PCR System 9600

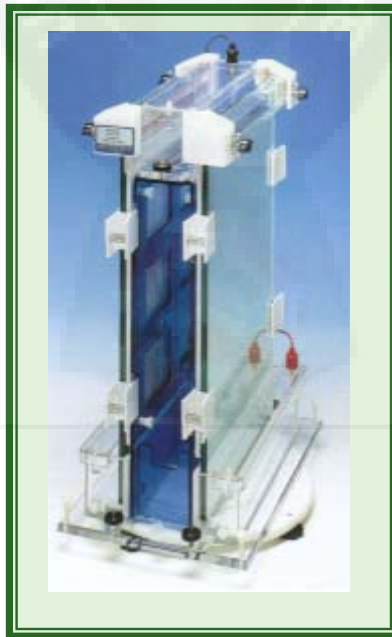


Campana de trabajo e irradiación UV. PCR

ANEXO 3

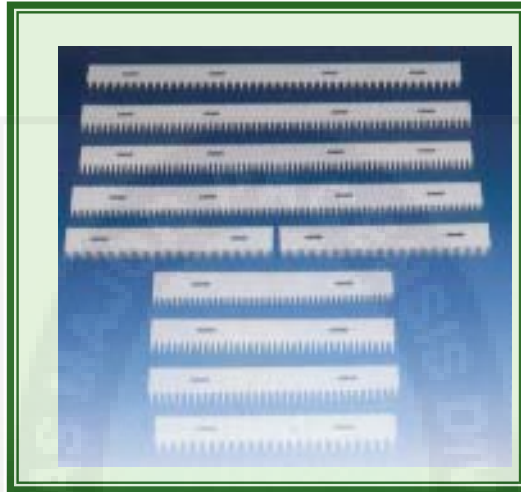


Cámara de secuenciación de ADN de doble ajuste

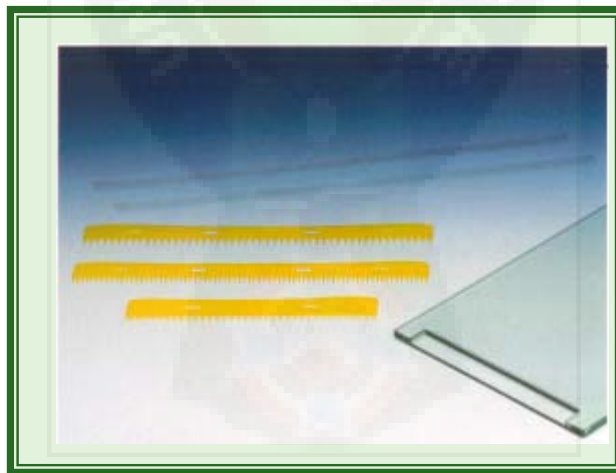


Cámara de secuenciación de ADN (Vista Lateral)

ANEXO 4



Set de peines dientes de tiburón

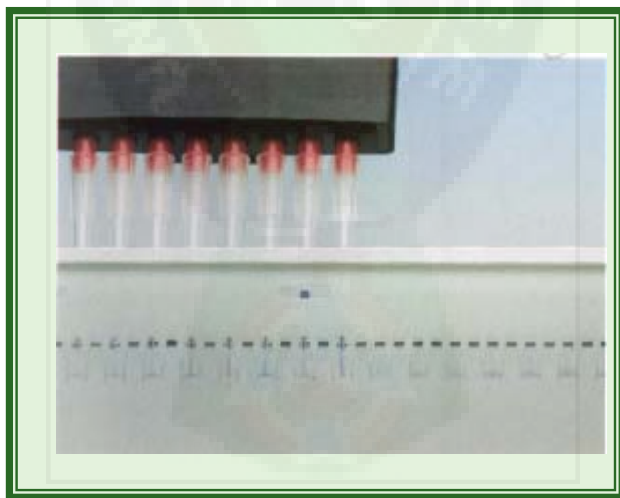


Espaciadores, peines dientes de tiburón y placas de vidrio

ANEXO 5



Cargado de muestras en la corrida electroforética



**Cargado múltiple con una micropipeta de ocho entradas
en las placas de vidrio**

ANEXO 6



**Verificación del montaje y las características de seguridad
del secuenciador**



Bandejas de revelado del gel de poliacrilamida

ANEXO 7

BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN AFROAMERICANA

F13A01			F13B			FESFPS			LPL			HPRTB		
homozygotes	49		homozygotes	59		homozygotes	44		homozygotes	67		homozygotes	32	
heterozygotes	169		heterozygotes	161		heterozygotes	176		heterozygotes	152		heterozygotes	77	
total simples	218		total simples	220		total simples	220		total simples	219		total simples	109	
allele	AF*	N**	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N
3.2	0.087	38	6	0.384	169	7	0.009	4	7	0.000	0	6	0.000	0
4	0.076	33	7	0.157	69	8	0.109	48	8	0.002	1	7	0.000	0
5	0.342	149	8	0.100	44	9	0.057	25	9	0.146	64	8	0.000	0
6	0.131	57	9	0.243	107	10	0.241	106	10	0.370	162	9	0.023	5
7	0.195	85	10	0.114	50	11	0.355	156	11	0.151	66	10	0.018	4
8	0.067	29	11	0.002	1	12	0.182	80	12	0.272	119	11	0.106	23
9	0.009	4	12	0.000	0	13	0.045	20	13	0.059	26	12	0.349	76
10	0.005	2	All	1.000	440	14	0.002	1	14	0.000	0	13	0.211	46
11	0.009	4				All	1.000	440	All	1.000	438	14	0.202	44
12	0.011	5										15	0.073	16
13	0.032	14										16	0.018	4
14	0.021	9										17	0.000	0
15	0.014	6										All	1.000	218
16	0.002	1												
All	1.000	436												
CSF1PO			TH01			TPOX			Vwa					
homozygotes	40		homozygotes	60		homozygotes	55		homozygotes	38				
heterozygotes	180		heterozygotes	161		heterozygotes	166		heterozygotes	182				
total simples	220		total simples	221		total simples	221		total simples	220				
allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N			
5	0.002	1	5	0.005	2	6	0.050	22	11	0.009	4			
6	0.002	1	6	0.152	67	7	0.034	15	12	0.000	0			
7	0.066	29	7	0.376	166	8	0.353	156	13	0.011	5			
8	0.073	32	8	0.233	103	9	0.192	85	14	0.064	28			
9	0.041	18	9	0.127	56	10	0.113	50	15	0.211	93			
10	0.273	120	9.3	0.090	40	11	0.210	93	16	0.264	116			
11	0.232	102	10	0.018	8	12	0.048	21	17	0.207	91			
12	0.261	115	11	0.000	0	13	0.000	0	18	0.143	63			
13	0.045	20	All	1.000	442	All	1.000	442	19	0.073	32			
14	0.002	1							20	0.016	7			
15	0.002	1							21	0.002	1			
All	1.000	440							All	1.000	440			
D16S539			D7S820			D13S317								
homozygotes	48		homozygotes	52		homozygotes	66							
heterozygotes	167		heterozygotes	163		heterozygotes	149							
total simples	215		total simples	215		total simples	215							
allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N						
5	0.002	1	6	0.002	1	7	0.002	1						
6	0.000	0	7	0.012	5	8	0.033	14						
7	0.000	0	8	0.179	77	9	0.019	8						
8	0.023	10	9	0.084	36	10	0.026	11						
9	0.205	88	10	0.351	151	11	0.309	133						
10	0.093	40	11	0.235	101	12	0.414	178						
11	0.316	136	12	0.112	48	13	0.149	64						
12	0.202	87	13	0.019	8	14	0.049	21						
13	0.133	57	14	0.007	3	15	0.000	0						
14	0.026	11	All	1.000	430	All	1.000	430						
All	1.000	430												

*AF = allele frequency
 **N = number of alleles observed

ANEXO 8

BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN CAUCASICOAMERICANA

F13A01			F13B			FESFPS			LPL			HPRTB		
homozygotes 49 heterozygotes 158 total samples 207			homozygotes 51 heterozygotes 154 total samples 205			homozygotes 64 heterozygotes 149 total samples 213			homozygotes 47 heterozygotes 157 total samples 204			homozygotes 28 heterozygotes 79 total samples 107		
allele	AF*	N**	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF*	N**
3.2	0.085	35	6	0.100	41	7	0.000	0	7	0.000	0	6	0.000	0
4	0.041	17	7	0.020	8	8	0.014	6	8	0.002	1	7	0.005	1
5	0.208	86	8	0.259	106	9	0.007	3	9	0.047	19	8	0.000	0
6	0.287	119	9	0.215	88	10	0.284	121	10	0.412	168	9	0.028	6
7	0.329	136	10	0.402	165	11	0.439	187	11	0.287	117	10	0.051	11
8	0.017	7	11	0.002	1	12	0.225	96	12	0.203	83	11	0.136	29
9	0.000	0	12	0.002	1	13	0.028	12	13	0.049	20	12	0.341	73
10	0.000	0	All	1.000	410	14	0.002	1	14	0.000	0	13	0.229	49
11	0.000	0				All	1.000	426	All	1.000	408	14	0.150	32
12	0.002	1										15	0.047	10
13	0.005	2										16	0.014	3
14	0.017	7										17	0.000	0
15	0.010	4										All	1.000	214
16	0.000	0												
All	1.000	414												
CSF1PO			TH01			TPOX			vWA					
homozygotes 47 heterozygotes 168 total samples 215			homozygotes 50 heterozygotes 163 total samples 213			homozygotes 76 heterozygotes 139 total samples 215			homozygotes 38 heterozygotes 182 total samples 220					
allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N			
6	0.000		5	0.007	3	6	0.002	1	11	0.000	0			
7	0.000		6	0.237	101	7	0.000	0	12	0.000	0			
8	0.002		7	0.148	63	8	0.528	227	13	0.000	0			
9	0.033		8	0.117	50	9	0.093	40	14	0.131	56			
10	0.251		9	0.155	66	10	0.056	24	15	0.082	35			
11	0.309		9.3	0.331	141	11	0.284	122	16	0.211	90			
12	0.330		10	0.005	2	12	0.037	16	17	0.265	113			
13	0.060		11	0.000	0	13	0.000	0	18	0.202	86			
14	0.014		All	1.000	426	All	1.000	430	19	0.087	37			
15	0.000								20	0.021	9			
All	1.000	440							All	1.000	426			
D16S539			D7S820			D13S317								
homozygotes 57 heterozygotes 153 total samples 210			homozygotes 43 heterozygotes 167 total samples 210			homozygotes 66 heterozygotes 149 total samples 215								
allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N						
5	0.000	0	6	0.002	1	7	0.000	0						
6	0.000	0	7	0.010	4	8	0.143	60						
7	0.000	0	8	0.155	65	9	0.052	22						
8	0.026	011	9	0.152	64	10	0.052	22						
9	0.107	45	10	0.295	124	11	0.305	128						
10	0.079	33	11	0.195	82	12	0.307	129						
11	0.319	134	12	0.121	51	13	0.083	35						
12	0.269	113	13	0.057	24	14	0.057	24						
13	0.167	70	14	0.012	5	15	0.000	0						
14	0.031	13	All	1.000	420	All	1.000	420						
15	0.002	1												
All	1.000	420												

*AF = allele frequency
**N = number of alleles observed

ANEXO 9

BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN HISPANOAMERICANA

F13A01			F13B			FESFPS			LPL			HPRTB		
homozygotes	45		homozygotes	80		homozygotes	68		homozygotes	66		homozygotes	32	
heterozygotes	177		heterozygotes	137		heterozygotes	142		heterozygotes	144		heterozygotes	75	
total samples	222		total samples	217		total samples	210		total samples	210		total samples	107	
allele	AF*	N**	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N
3.2	0.225	100	6	0.051	22	7	0.002	1	7	0.000	0	6	0.000	0
4	0.113	50	7	0.018	8	8	0.012	5	8	0.002	1	7	0.000	0
5	0.227	101	8	0.129	56	9	0.010	4	9	0.029	12	8	0.000	0
6	0.164	73	9	0.362	157	10	0.176	74	10	0.502	211	9	0.000	0
7	0.227	101	10	0.435	189	11	0.452	190	11	0.224	94	10	0.005	1
8	0.014	6	11	0.005	2	12	0.233	98	12	0.207	87	11	0.065	14
9	0.000	0	12	0.000	0	13	0.110	46	13	0.033	14	12	0.276	59
10	0.000	0	All	1.000	434	14	0.005	2	14	0.002	1	13	0.369	79
11	0.007	3				All	1.000	420	All	1.000	420	14	0.210	45
12	0.000	0										15	0.056	12
13	0.005	2										16	0.019	4
14	0.005	2										17	0.000	0
15	0.007	3										All	1.000	214
16	0.007	3												
All	1.000	444												
CSF1PO			TH01			TPOX			vWA					
homozygotes	66		homozygotes	54		homozygotes	72		homozygotes	52				
heterozygotes	152		heterozygotes	166		heterozygotes	148		heterozygotes	160				
total samples	218		total samples	220		total samples	220		total samples	212				
allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N			
6	0.000	0	5	0.000	0	6	0.005	2	11	0.000	0			
7	0.002	1	6	0.239	105	7	0.002	1	12	0.000	0			
8	0.005	2	7	0.309	136	8	0.502	221	13	0.005	2			
9	0.025	11	8	0.086	38	9	0.089	39	14	0.066	28			
10	0.241	105	9	0.139	61	10	0.052	23	15	0.101	43			
11	0.296	129	9.3	0.218	96	11	0.248	109	16	0.295	125			
12	0.358	156	10	0.009	4	12	0.102	45	17	0.271	115			
13	0.060	26	11	0.000	0	13	0.000	0	18	0.165	70			
14	0.007	3	All	1.000	440	All	1.000	440	19	0.080	34			
15	0.007	3							20	0.017	7			
All	1.000	436							21	0.000	0			
									All	1.000	424			
D16S539			D7S820			D13S317								
homozygotes	45		homozygotes	38		homozygotes	46							
heterozygotes	162		heterozygotes	169		heterozygotes	161							
total samples	207		total samples	207		total samples	207							
allele	AF	N	allele	AF	N	allele	AF	N						
5	0.000	0	6	0.000	0	7	0.000	0						
6	0.000	0	7	0.019	8	8	0.087	36						
7	0.000	0	8	0.099	41	9	0.184	76						
8	0.012	5	9	0.075	31	10	0.077	32						
9	0.101	42	10	0.283	117	11	0.229	95						
10	0.181	75	11	0.266	110	12	0.244	101						
11	0.300	124	12	0.220	91	13	0.121	50						
12	0.268	111	13	0.031	13	14	0.053	22						
13	0.118	49	14	0.007	3	15	0.005	2						
14	0.019	8	All	1.000	414	All	1.000	414						
All	1.000	414												

*AF = allele frequency
 **N = number of alleles observed

ANEXO 10

BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN PARAGUAYA

F13A01		FESFPS		vWA	
Alelo	FA	Alelo	FA	Alelo	FA
3.2	0.0799	7	0.0000	11	0.0000
4	0.0399	8	0.0155	12	0.0000
5	0.2098	9	0.0119	13	0.0000
6	0.2902	10	0.2831	14	0.1299
7	0.3278	11	0.4797	15	0.0697
8	0.0197	12	0.1788	16	0.1871
9	0.0000	13	0.0298	17	0.2598
10	0.0000	14	0.0012	18	0.1800
11	0.0000	Total	1.0000	19	0.0799
12	0.0000			20	0.0939
13	0.0000			21	0.0000
14	0.0000			Total	1.0000
15	0.0000				
16	0.0000				
Total	1.0000				
CSF1PO		THO1		TPOX	
Alelo	FA	Alelo	FA	Alelo	FA
6	0.0000	5	0.0060	6	0.0125
7	0.0000	6	0.2300	7	0.0000
8	0.0089	7	0.1472	8	0.6114
9	0.1043	8	0.1323	9	0.0381
10	0.1967	9	0.1597	10	0.0238
11	0.2500	9.3	0.3218	11	0.2473
12	0.3933	10	0.0030	12	0.0667
13	0.0298	11	0.0000	13	0.0000
14	0.0167	Total	1.0000	Total	1.0000
15	0.0000				
Total	1.0000				
D16S539		D7S820		D13S317	
Alelo	FA	Alelo	FA	Alelo	FA
5	0.0000	6	0.0060	7	0.0131
6	0.0000	7	0.0197	8	0.0328
7	0.0000	8	0.0036	9	0.0209
8	0.0298	9	0.0858	10	0.0173
9	0.0799	10	0.3743	11	0.3650
10	0.0715	11	0.3516	12	0.3970
11	0.3218	12	0.1234	13	0.1317
12	0.3051	13	0.0280	14	0.0262
13	0.1621	14	0.0077	15	0.0000
14	0.0298	Total	1.0000	Total	1.0000
15	0.0000				
Total	1.0000				

ANEXO 12

BASE DE DATOS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN COLOMBIANA

FRECUENCIAS ALELICAS POR CIUDAD, PARA EL MARCADOR CSFIPO

ALELO	B/QUILLA	BOGOTA	CALI	CUCUTA	MEDELLIN
7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0179
8	0,0263	0,0000	0,0167	0,0357	0,0357
9	0,0000	0,0167	0,0000	0,0000	0,0357
10	0,1842	0,2000	0,2833	0,3036	0,2679
11	0,3158	0,3000	0,1500	0,2679	0,2500
12	0,3421	0,3833	0,5333	0,3571	0,3393
13	0,1053	0,0833	0,0167	0,0357	0,0357
14	0,0263	0,0167	0,0000	0,0000	0,0179
15	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
TOTAL	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

FRECUENCIAS ALELICAS POR CIUDAD, PARA EL MARCADOR TPOX

ALELO	B/QUILLA	BOGOTA	CALI	CUCUTA	MEDELLIN
6	0,0000	0,0000	0,0167	0,0000	0,0000
7	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8	0,5000	0,5000	0,4667	0,4286	0,4643
9	0,1316	0,0517	0,0833	0,1071	0,0536
10	0,0263	0,0517	0,0833	0,0536	0,0714
11	0,2105	0,2931	0,2667	0,3036	0,3214
12	0,1316	0,1034	0,0833	0,1071	0,0893
13	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
TOTAL	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

FRECUENCIAS ALELICAS POR CIUDAD, PARA EL MARCADOR TH 01

ALELO	B/QUILLA	BOGOTA	CALI	CUCUTA	MEDELLIN
5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
6	0,2632	0,3500	0,3667	0,3036	0,4107
7	0,3158	0,2667	0,2833	0,2857	0,2321
8	0,1053	0,1167	0,1000	0,0893	0,1071
9	0,1579	0,1500	0,0833	0,1429	0,1071
9,3	0,1579	0,0833	0,1333	0,1429	0,1429
10	0,0000	0,0333	0,0333	0,0357	0,0000
11	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
TOTAL	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

FRECUENCIAS ALELICAS POR CIUDAD v WA

ALELO	B/QUILLA	BOGOTA	CALI	CUCUTA	MEDELLÍN
13	0,0139	0,0143	0,0086	0,0000	0,0208
14	0,0833	0,1286	0,0862	0,0577	0,0208
15	0,0694	0,0286	0,0517	0,0769	0,1042
16	0,3333	0,3714	0,3879	0,4231	0,4167
17	0,2917	0,3571	0,2672	0,1923	0,2083
18	0,1250	0,0571	0,1379	0,0962	0,1458
19	0,0694	0,0429	0,0603	0,1538	0,0833
20	0,0139	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

FRECUENCIAS ALELICAS POR CIUDAD F13A01

ALELO	B/QUILLA	BOGOTA	CALI	CUCUTA	MEDELLIN
3	0,0000	0,1216	0,1240	0,0833	0,1042
4	0,3472	0,2432	0,2231	0,0833	0,1458
5	0,1806	0,2568	0,1653	0,3500	0,1458
6	0,2500	0,1351	0,1901	0,3000	0,3542
7	0,1389	0,2162	0,2066	0,1333	0,1667
8	0,0556	0,0270	0,0661	0,0167	0,0208
9	0,0139	0,0000	0,0083	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0208
12	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
13	0,0000	0,0000	0,0083	0,0167	0,0208
14	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0083	0,0000	0,0000
16	0,0138	0,0000	0,0000	0,0167	0,0208