

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS



MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO PARA LA
IMPLEMENTACIÓN Y UTILIZACIÓN EN UN
LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE.
Identificación Genética y Pruebas de Paternidad.

Autor: *Bernardo Nicolás Torrico Arzady, M.Sc.*

Tutor: *Enrique Terrazas, Ph.D.*

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE
ESPECIALIDAD EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FORENSES

La Paz – Bolivia
2006

TRIBUNAL CALIFICADOR:

Dra. Ketty Velarde, M.Sc.

Dra. Vesna Boric, M.Sc.

Dr. Giovanni Garcia, M.Sc.

“Lo cercano nunca está cerca de quien está lejos de Dios; quien no se acerca al prójimo se aparta de Dios”. Del libro Leyendas del Cielo y de la Tierra de Malba Tahan.

Dedicado a la Luz que ilumina mi vida: a Jesús.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS:

A la Dra. Susana Revollo Zepita, Ph.D. por ser la precursora de la Especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses.

A los Docentes de la Especialidad, en especial a la Dra. Lisbeth Borjas de la Universidad de Zulia-Venezuela, por los conocimientos y la transferencia de tecnología en Genética Forense.

Al Tribunal Calificador del presente Trabajo Dirigido: Dra. Ketty Velarde, Dra. Vesna Boris y Dr. Giovanni Garcia, por el tiempo dedicado al trabajo.

Al Dr. Enrique Terrezas, por las sugerencias realizadas.

RESUMEN

El presente trabajo dirigido se constituye en un manual teórico práctico que pretende poner al alcance de los profesionales dedicados al área de genética forense y sobre todo de los estudiantes interesados en el tema, los fundamentos genéticos de la individualidad humana y los métodos actualmente en uso, en el terreno de la identificación, tanto en la práctica forense como en casos de paternidad o parentesco dudoso. Experiencias recogidas durante el curso de Especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses, como en la trayectoria personal dedicada a la biología molecular, a la ingeniería genética y biotecnología y a la citogenética humana.

Concientes del avance tecnológico de la genética y la biología molecular y el tratamiento estadístico de los datos, en el presente estudio se establece los fundamentos del estudio de la identidad genética de los individuos, revisando luego los marcadores genéticos de importancia en el área forense, antropológica y biomédica. Posteriormente se describen las diferentes técnicas moleculares empleadas en los laboratorios de genética forense como también, los principios fundamentales que rigen a estos laboratorios. Se presenta un conjunto de técnicas de laboratorio que en su mayoría fueron estandarizadas por el autor gracias a la transferencia de tecnología con la Universidad de Zulia de la república de Venezuela. Estas técnicas incluyen desde la extracción del DNA de diferentes muestras biológicas y de evidencias, hasta su procesamiento a través de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la interpretación estadística de los resultados. Se describe minuciosamente los fundamentos para el procesamiento de los datos por métodos estadísticos. Se analiza algunos principios de la genética de poblaciones como el equilibrio de Hardy y Weinberg y se realiza una introducción a la interpretación de la evidencia, por ejemplo a través del análisis de Bayes.

Se presentan diferentes ejemplos de interpretación de marcadores genéticos en la determinación de la inclusión o exclusión de la paternidad. Finalmente en el capítulo referente a las consideraciones finales, se presenta algunos aspectos útiles sobre los ácidos nucleicos, como ser su peso molecular, algunos factores de conversión, condiciones de almacenamiento para el DNA genómico y para oligonucleótidos, algunas consideraciones de bioseguridad, y otros aspectos.

El “Manual teórico práctico para la implementación y utilización en un laboratorio de genética forense” presenta un glosario de términos de uso frecuente en genética forense, que sirve de guía para quienes comienzan su estudio en esta fascinante área del conocimiento. De esta manera, estamos seguros de haber contribuido al desarrollo científico de la genética forense en nuestro país; hoy en día, cuando las pruebas biológicas son aceptadas como evidencia en los tribunales, a consecuencia de la modernización de la legislación boliviana.

INDICE

I. SECCIÓN DIAGNÓSTICA

1. INTRODUCCIÓN A LA NECESIDAD DE LA ELABORACIÓN DEL MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO DE GENÉTICA FORENSE	1
2. OBJETIVO PRINCIPAL	2
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. RESULTADOS ESPERADOS	3
5. DISEÑO DE ESTUDIO	4
TIPO DE ESTUDIO	4

II. SECCIÓN PROSPECTIVA:

MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN Y UTILIZACIÓN EN UN LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE. Identificación Genética y Pruebas de Paternidad	4
---	---

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA IDENTIDAD GENÉTICA.

1. Principios básicos de la teoría genética	4
2. Aplicaciones de la teoría genética a la determinación del parentesco	7
3. Herramientas de la genética molecular:	
El DNA como material de análisis en la determinación de paternidad	8
La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	9
Enzimas de restricción.	10
Southern Blot.	10
Dot Blot.	11
Secuenciación del DNA.	11
Sondas alelo específicas (PCR-sondas ASO)	12
Utilización de otras sondas para la identificación específica de DNA	13
La Sonda pAV 33.7.	15
Las Sondas 33.15 y 33.6: El patrón individual de bandas.	16
La técnica MVR-PCR para el análisis de la movilidad genética.	20
4. El polimorfismo del DNA como base de la identidad genética.	23
5. Identificación y características de los marcadores genéticos.	25

CAPÍTULO II. EL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE.

1. De los requerimientos.	27
2. De los Peritos Forenses.	
3. De la seguridad del personal	28
4. De las muestras biológicas e indicios.	32
5. Comunicación de resultados.	33
6. De los programas de garantía de calidad de los LGF.	33
7. Aplicaciones de la prueba del DNA en el campo forense.	35

CAPÍTULO III. MARCADORES GENÉTICOS. IMPORTANCIA ANTROPOLÓGICA Y BIOMÉDICA.

1. introducción.	36
2. ANTÍGENOS DE MEMBRANA ERITROCITARIA	39
Grupos Sanguíneos.	39
Sistema ABO.	39
Sistema Rh-Hr.	40
Sistema MNSs	41
Sistema Duffy	42
Sistema P.	42
Sistema Kidd.	43
Sistema Kell.	43
Sistemas secretor y de Lewis.	43
Sistema Diego.	44
3. ANTÍGENOS DE MEMBRANA LEUCOCITARIA.	
Sistema HLA o Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).	44
4. PROTEÍNAS ERITROCITARIAS.	
Hemoglobinas (HB).	46
Glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PD).	47
5. MARCADORES GENÉTICOS EXTRAERITROCITARIOS.	
Haptoglobinas (HP).	47
Componentes de grupo específico (GC).	48
Transferrina (Tf).	49
Albúmina (Alb).	49
6. POLIMORFISMOS DE DNA.	50
7. La huella genética o perfil del DNA.	52
8. Criterios para la selección de marcadores genéticos.	54

CAPÍTULO IV. ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES DE APLICACIÓN EN GENÉTICA FORENSE.

1. TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO.	
1) Técnica de extracción FTA (Gibco BR).	57
2) Extracción de DNA en mezclas de secreción vaginal, sangre o semen.	58
3) Extracción de DNA a partir de muestras de sangre.	
Método RED-EXTRACT Amp Blood Kits.	60
4) Extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica.	60
5) Extracción de DNA a partir de sangre, método Gen Elute (Sigma)	62
6) Extracción de DNA de apéndices pilosos.	63
7) Extracción de DNA a partir de manchas (DLB).	63
8) Extracción de DNA en manchas de fluidos biológicos diversos.	64
9) Extracción de DNA a partir de restos óseos.	65
10) Extracción con fenol-cloroformo.	66
11) Extracción de DNA a partir de células de mucosa bucal.	68
12) Protocolo de extracción de DNA de tejidos diversos.	69
13) Extracción de DNA con el protocolo <i>Wizard DNA Purification kit</i> .	70

2. EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD, INTEGRIDAD Y CALIDAD DE LAS MUESTRAS AISLADAS.	
1) Preparación de gel de agarosa al 2.0%	72
2) Evaluación del estado del DNA por electroforesis de agarosa	72
3) Preparación de geles de poliacrilamida.	74
3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y ANÁLISIS DE REGIONES HIPERVARIABLES DEL GENOMA.	
1) PCR-KIT-RED Extract N-Amp Blood PCR kits.	75
2) PCR del Genoma Total.	77
3) Regiones Hipervariables del Genoma. Marcadores STRs autosómicos.	80
Características de los Productos Amplificados.	83
Elaboración del gel 5% PAGE de caracterización Alélica.	83
Electroforesis y detección de los productos amplificados.	85
4) Caracterización de secuencias polimórficas del cromosoma Y.	86
4. OTRAS TÉCNICAS LABORATORIALES.	
1) Digestión del DNA con la enzima de restricción Hae III.	89
2) Precipitación de las muestras digeridas.	90
3) Separación de los fragmentos de DNA por electroforesis.	91
4) Secado del gel.	92
5) Marcación de la Sonda (CAC) ₅ con ³² P.	93
6) Hibridación de la Sonda radiactiva al DNA inmovilizado en el gel seco.	94
7) Exposición autorradiográfica del gel hibridado.	97
8) Caracterización genética del Sistema HLA Clase I. Detección de polimorfismos.	98
5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS.	104
CAPÍTULO V. ASPECTOS POBLACIONALES Y BIOESTADÍSTICA DE LAS PRUEBAS DEL DNA.	
1. INTRODUCCIÓN: INTERPRETACIÓN DE LA EVIDENCIA.	107
2. ANÁLISIS DE BAYES.	108
3. DE LA EXCLUSIÓN A LA ATRIBUCIÓN DE PATERNIDAD.	110
4. FRECUENCIAS GÉNICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS DETERMINADAS POR UN PAR DE GENES.	112
Cálculo de la frecuencia génica por cuenta simple.	112
Cálculo de la frecuencia génica con la ley de Hardy-Weinberg.	113
5. VARIABILIDAD DE LAS FRECUENCIAS GÉNICAS DE UNA GENERACIÓN A LAS SIGUIENTES.	115
6. El teorema de equilibrio de Hardy y Weinberg.	118
7. Cálculo de la probabilidad de Exclusión.	121
8. Cálculo del índice de paternidad en el Sistema ABO.	124
9. Resumen de los parámetros estadísticos de interés forense.	127
Cálculo de la paternidad.	127
El teorema de Bayes.	129

CAPÍTULO VI. CONSIDERACIONES FINALES.	
1. INFORMACIÓN UTIL SOBRE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.	
Peso molecular de un oligonucleótido.	129
Factores de conversión.	130
Condiciones de almacenamiento para DNA genómico.	130
Condiciones de almacenamiento para oligonucleótidos.	130
2. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.	130
III. SECCIÓN CONCLUSIVA	
1. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA GENÉTICA FORENSE	132
1.1. Pruebas genéticas	132
a) Beneficios Clínicos	
b) Beneficios Psicológicos Sociales	
c) Beneficios para la salud pública	
1.2. Limitaciones a las pruebas genéticas predictivas	132
2. RECOMENDACIONES FINALES PARA LA UIMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE EN BOLIVIA	133
BIBLIOGRAFÍA.	134
ANEXOS.	137
1. Glosario de términos de uso frecuente en Genética Forense.	137

I. SECCIÓN DIAGNÓSTICA.-

1.- INTRODUCCIÓN A LA NECESIDAD DE LA ELABORACIÓN DEL MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO DE GENÉTICA FORENSE.

El gran desarrollo que ha tenido la genética durante el presente siglo y los avances alcanzados por la biología molecular, ofrecen hoy en día la oportunidad de precisar la identidad biológica y el parentesco entre individuos de una misma especie, así como también adjudicar el origen de pequeñas muestras de tejido a un individuo en particular.²

Es así que la investigación forense, actualmente se respalda de la evidencia científica; es decir de los resultados obtenidos en un laboratorio. Concientes de que la gran velocidad con que avanzan la ciencia y la tecnología, impone un gran esfuerzo para la puesta al día en los progresos del conocimiento, queremos poner al alcance de los profesionales dedicados al área de la genética forense y sobre todos de los estudiantes interesados en el tema los fundamentos genéticos de la individualidad humana y los métodos actualmente en uso, en el terreno de la identificación, tanto en la práctica forense como en casos de paternidad o parentesco dudoso. Experiencias recogidas durante el curso de Especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses, como en la trayectoria personal dedicada a la biología molecular, a la ingeniería genética y biotecnología y a la citogenética humana.⁵

Es especialmente importante comprender la naturaleza de estas técnicas y su interpretación, hoy en día, cuando las pruebas biológicas son aceptadas como evidencia en los tribunales, a consecuencia de la modernización de la legislación boliviana.

Los forenses y criminalistas han aceptado desde hace ya varios años que la tipificación del DNA como método identificatorio en casos de homicidios,

violaciones, y otras acciones delictivas, representa el avance más revolucionario de este siglo desde la utilización del estudio de las huellas dactilares. Estas pruebas biológicas que tuvieron que pasar “muchas pruebas” durante los años ochenta y noventa, son actualmente aceptadas y tomadas en cuenta por los tribunales de todo el mundo, tanto para esclarecer los casos criminales, homicidios y delitos sexuales como para definir complejos casos de paternidad y de otros vínculos de parentesco.^{1, 2, 5}

En el presente trabajo dirigido se exponen los fundamentos genéticos de la individualidad humana y se describe en detalle las distintas técnicas que se utilizan en problemas de identificación genética, con especial énfasis en las pruebas de paternidad. Se describe las metodologías de análisis de los marcadores genéticos más usados con este propósito en el transcurso del desarrollo de la genética forense como son los grupos sanguíneos, antígenos del sistema HLA y actualmente los polimorfismos del DNA. Se hace una acuciosa exposición de cómo deben interpretarse los resultados de estas pruebas aplicando parámetros estadísticos. Se estudia la matrilinea y la patrilinea a partir de marcadores genéticos del DNA mitocondrial y del DNA del cromosoma Y, respectivamente.

Finalmente dedicamos un espacio al tratamiento de los aspectos científicos de la genética de poblaciones, la epigenética y la genómica, en la identidad forense y otros aspectos.

2.- OBJETIVO PRINCIPAL.-

Desarrollar y elaborar un manual teórico práctico para la implementación y utilización en un laboratorio de Genética Forense con los fundamentos genéticos de la individualidad humana y los métodos actuales en uso en el terreno de la identificación, la práctica forense y los casos de paternidad o parentesco dudoso.

3.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

- 1) Describir en detalle los fundamentos genéticos y moleculares en la práctica de la genética forense.
- 2) Estandarizar las distintas técnicas que se utilizan en laboratorio en problemas de identificación genética y las metodologías de análisis de los marcadores genéticos: desde la toma de muestra e indicios, purificación de ácidos nucleicos y técnicas moleculares para el estudio del DNA.
- 3) Realizar y estandarizar diferentes técnicas para la extracción de DNA a partir de diferentes tejidos orgánicos.
- 4) Evaluar la cantidad, integridad y calidad de las muestras aisladas.
- 5) Desarrollar diferentes protocolos para la aplicación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificar secuencias altamente polimórficas del genoma humano, modalidad PCR multiplex.
- 6) Describir otras técnicas moleculares de aplicación forense.
- 7) Describir la organización del laboratorio de genética forense, sus postulados, las características de los peritos forenses, y los programas de garantía de la calidad.
- 8) Desarrollar una acuciosa exposición de cómo deben interpretarse sus resultados, aplicando la bioestadística forense.
- 9) Analizar los principios fundamentales de la genética de poblaciones, sus métodos estadísticos y su aplicación en la genética forense.

4.- RESULTADOS ESPERADOS.-

Qué el contenido del manual sintetice la experiencia teórico práctica adquirida en Genética Forense, durante el Curso de especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses de la UMSA, y que se constituya en un instrumento de consulta permanente en los laboratorios de Genética Forense, por los profesionales dedicados al área.

5.- DISEÑO DEL ESTUDIO.-

9.1. Tipo de Estudio.- Experimental y Descriptivo

Experimental.- Estandarización de técnicas para la purificación de DNA a partir de muestras biológicas y de evidencias. Estandarización de técnicas para la amplificación del DNA a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estandarización de técnicas para la determinación de la paternidad (amplificación de marcadores genéticos).

Descriptivo.- Elaboración del Manual de Genética Forense.

II. SECCIÓN PROSPECTIVA:

MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN Y UTILIZACIÓN EN UN LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE. *Identificación Genética y Pruebas de Paternidad.*

Capítulo I.- INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA IDENTIDAD GENÉTICA.

1) Principios básicos de la teoría genética.

La identidad biológica radica en nuestros genes. Son ellos los que definen nuestra idiosincrasia dentro de la especie a la cual pertenecemos y son ellos los que nos hacen diferentes a unos de otros. Para comprender la naturaleza de nuestra individualidad biológica es necesario conocer cómo se comporta el material hereditario y cómo éste se transmite de una generación a otra.²

Toda la información para el desarrollo de nuestro organismo y su funcionamiento está en nuestros genes. Un gen es la unidad de información biológica heredable de padres a hijos y tiene su sustrato orgánico en la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que se ubica en el núcleo de todas las células del organismo, y una pequeña cantidad en el interior de las mitocondrias.^{1, 2, 5}

Mucho antes de conocerse la naturaleza orgánica de los genes, el biólogo Gregorio Mendel estableció los fundamentos de la herencia biológica, en su formulación de lo que se conoce como los "principios mendelianos de la herencia".⁵

Podemos resumir los principios básicos de la genética siguiendo el esquema de la figura 1.1

	♀	x	♂
GENOTIPO:	Aa		Aa
GAMETOS:	A	a	A a
GENOTIPOS POSIBLES EN LOS DESCENDIENTES:	AA	Aa	Aa aa

Figura 1.1: Esquema del Principio mendeliano de la segregación de genes.

Todos los individuos (mamíferos) llevan en cada una de las células somáticas de su organismo, dos copias de cada gen; cada copia se ha simbolizado en la figura con una letra. Al producir los gametos (células sexuales), estos genes se segregan, de modo que sólo una copia de cada gen estará presente en cada gameto (óvulo o espermatozoide). Al ocurrir el encuentro del gameto masculino con el gameto femenino durante la fecundación, se produce un huevo o cigoto que contiene dos copias de cada gen (una proveniente del espermatozoide y otra proveniente del óvulo); estas dos copias de cada gen pueden ser iguales (homocigotos) o distintas (heterocigotos).^{1,5}

El conjunto de genes (tanto de origen paterno como materno) se denomina el *genotipo* o constitución genética de cada individuo y depende, por lo tanto, de los genes recibidos del padre (una mitad) y de aquellos recibidos de la madre (la otra mitad). El genotipo y la influencia del ambiente en el cual el individuo se desarrolla, determinan las características que el individuo posee, a las cuales

llamamos *fenotipo*. De esta manera, cada individuo de nuestra especie tiene un genotipo, al cual han contribuido en igual medida, genes maternos y paternos. El individuo se desarrolla hasta la edad adulta y produce gametos, en los cuales estará representado cada gen una sola vez; y, del encuentro entre dos gametos, surgirá un nuevo individuo.²

La estabilidad e integridad de nuestros genes está resguardada por un conjunto de mecanismos celulares. La transmisión y segregación de los genes, durante la división celular y la producción de gametos, se basa en la capacidad del ADN de replicarse en forma semiconservativa. A través de este mecanismo, las dos hebras complementarias de DNA se separan y cada una de ellas sirve de molde para la síntesis de una hebra nueva, garantizando de esta forma la duplicación fiel de la molécula original. Alteraciones en los mecanismos que mantienen la estabilidad del material hereditario o que permiten su replicación, pueden llevar a errores que se conocen con el nombre de *mutaciones*, las cuales ocurren con muy baja frecuencia (1 en cada 100.000 o un millón de gametos, por gen) en la mayoría de los marcadores genéticos utilizados con fines de identificación.^{1, 2}

Estos principios generales permiten comprender el parentesco genético, el cual depende de la proporción de genes idénticos por descendencia que los individuos poseen. Estos principios son aplicables a todos los genes existentes en el núcleo de todas las células de nuestro organismo.

Distinto es el caso de los genes que existen en el interior de nuestras mitocondrias, los cuales siguen un patrón de herencia diferente. El cigoto recién fecundado posee mitocondrias que provienen del citoplasma del óvulo; el espermatozoide al penetrar al oocito no incorpora en él sus mitocondrias, de modo que los genes mitocondriales son sólo de origen materno; por lo tanto, pueden ser útiles en problemas de identificación genética para verificar parentescos matrilineales, pero nunca para pruebas de paternidad u otro parentesco por vía

paterna. Para estudiar parentescos patrilineales que involucren solamente a individuos de sexo masculino, pueden ser útiles los polimorfismos detectables en el cromosoma Y. Los genes mitocondriales y aquellos que se ubican en el cromosoma Y constituyen una excepción a los principios mendelianos de la genética.³

2) Aplicaciones de la teoría genética a la determinación del parentesco.

Revisados los principios básicos de la teoría genética, podemos comprender que nuestra individualidad biológica radica en nuestro genotipo; y éste necesariamente es común, en alguna medida, con el genotipo de nuestros parientes. Para establecer relaciones de parentesco entre individuos, basándose en el genotipo de ellos y en su similitud genética, hay que considerar la proporción de genes en común que se espera que ellos posean, dado su parentesco biológico.^{5, 6, 7}

Las pruebas de identificación genética, además de permitir establecer parentesco biológico, son de gran utilidad en investigación criminal o en casos judiciales, cuando se quiere determinar el origen exacto de manchas, trazas o muestras de fluidos corporales o trozos de tejido humano que hayan quedado como evidencia en el lugar de un crimen. Los distintos tipos de técnicas que se utilizan en la genética forense permiten adjudicar o excluir a un acusado de su responsabilidad criminal; por lo tanto, representan una importante herramienta en la práctica forense.²

El demostrar genéticamente la relación de parentesco entre dos individuos puede tener importancia en problemas legales de variada naturaleza; uno de los más frecuentes son los problemas de paternidad dudosa, cuyo alcance excede el aspecto legal, sin embargo las metodologías son totalmente aplicables a problemas de maternidad dudosa, de intercambio de recién nacidos en servicios hospitalarios, o incluso a casos de identificación de nietos. En casos de estudios genéticos de *abuelidad* resultaron tremendamente informativos.²

En los problemas de identificación genética resulta muy importante la adecuada elección de los caracteres que se utilizarán en el estudio, ya que el fenotipo puede depender del ambiente o de interacciones del genotipo con el ambiente. Por lo tanto, pueden existir grandes diferencias fenotípicas, de origen ambiental, entre parientes cercanos.

3) Herramientas de la genética molecular.

El DNA como material de análisis en la determinación de paternidad.

Durante varios años las pruebas bioquímicas de paternidad han analizado proteínas, es decir, los productos de expresión de los genes. Un salto cualitativamente muy importante en estas pruebas lo constituyó la introducción de las herramientas de trabajo de la llamada Biología Molecular, que han permitido caracterizar y analizar variantes genéticas en la misma doble hebra de DNA, molécula asiento de la información genética.^{1, 2, 5}

Las técnicas de análisis de DNA orientadas a la investigación de paternidad, comenzaron a desarrollarse a mediados de la década de 1980 y están en vías de imponerse en una gran variedad de disciplinas que incluyen ciencias médico-forenses, genética y otros estudios.

Una contribución fundamental al desarrollo de esta técnica se debe al investigador británico Alec Jeffreys. Este análisis usa fundamentalmente dos herramientas que son ya habituales en la Biología Molecular: a) El corte del ADN nuclear en puntos específicos por la acción de enzimas bacterianas llamadas *enzimas de restricción*, lo que produce millares de fragmentos de longitud variable; y, b) el reconocimiento de algunos de estos fragmentos conteniendo secuencias de bases particulares, por su asociación específica a *sondas* o segmentos con secuencias de bases complementarias a aquellas de interés.

En general, tal asociación específica se visualiza por una marca radiactiva unida a la sonda.^{2,5}

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La PCR permite amplificar miles de moléculas de un fragmento de DNA de interés y visualizar los fragmentos de DNA. La *Reacción en Cadena de la Polimerasa* o *PCR* (del inglés Polymerase Chain Reaction), requiere contar con dos pequeños fragmentos de hebras simples de DNA, cuyas secuencias de bases son complementarias a segmentos que flanquean a la extensión de DNA que nos interesa detectar. Estos dos fragmentos se denominan iniciadores y delimitan el tamaño de un trozo de DNA que virtualmente se "reproduce" gracias a la acción de una enzima la taq DNA *polimerasa*, que sintetiza nuevas hebras de DNA al contar con un molde o *templado* y *desoxinucleótidos*, que son las piezas elementales o eslabones de estas cadenas.^{2, 6, 9}

En el procedimiento de la PCR es posible amplificar un segmento de DNA partiendo de muy poco templado. La amplificación se consigue efectuando repetidos *ciclos* de reproducción que se definen por etapas de incubación a diferentes temperaturas, en un equipo denominado termociclador. Tras cada ciclo se han generado nuevos fragmentos de DNA en progresión geométrica. El proceso finaliza cuando se ha obtenido una cantidad tan abundante de copias que pueden ser detectadas simplemente con una tinción que tenga afinidad con el DNA después de agruparlas por tamaños en un procedimiento de electroforesis.^{2, 18}

La PCR ha resultado ser una tecnología de un tremendo impacto en múltiples disciplinas de las ciencias biológicas. En el análisis forense de DNA, por ejemplo, ha permitido la reproducción o amplificación selectiva de fragmentos de DNA y de esta forma caracterizar genéticamente muestras con una cantidad reducidísima de material biológico.^{2, 18}

Enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción reconocen como blanco a pequeñas secuencias de DNA de doble tira y las cortan; estas secuencias abarcan de 4 a 8 nucleótidos y de manera usual son palíndromos y específicos para cada enzima. En principio, la distancia entre estos sitios de reconocimiento en el genoma debería ser al azar, pero su ocurrencia depende de la secuencia precisa del DNA que se está examinando, así que la medida del DNA cortado puede variar de 1 kilobase (Kb) a varias megabases (Mb), mientras el número de los diferentes fragmentos generados puede ir desde miles hasta millones. Cabe señalar que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño de la I secuencia que reconoce la enzima y el número de cortes que realiza en el genoma que se digiere.^{9, 13, 16}

Tabla 1.1. Secuencias blanco de algunas endonucleasas de restricción

ENZIMA	SECUENCIA BLANCO	CLASE
AluI	AG/CT	tetranucleótido
Hinfi	G/ANTC	pentanucleótido
PstI	CTGCA/G	hexanucleótido
HindII	GTPy/PuAC	hexanucleótido
BstEII	G/GTNACC	heptanucleótido
NotI	GC/GGCCGC	octanucleótido

N = cualquier base; Py = pirimidina; Pu = purina; / representa el sitio de corte.

Southern Blot.

Este método desarrollado por Edwin Southern en 1975, visualiza fragmentos específicos de DNA y de manera clásica consiste de varios pasos:^{20, 23, 24}

- **Digestión del DNA** mediante enzimas de restricción para generar fragmentos de DNA de diferentes tamaños.
- **Electroforesis**, separación, en un campo eléctrico de los fragmentos del DNA digerido que se basa en las diferencias en migración de los fragmentos. Así los pequeños migran más rápido y los grandes

más lento, lo que resulta en una escalera de fragmentos distribuidos a lo largo del gel.

- **Transferencia**, previa desnaturalización del DNA, a una membrana de nylon.
- **Hibridación**, donde la membrana de nylon se pone a aparear con sondas marcadas; dichas sondas son segmentos de DNA que reconocen, mediante complementariedad de bases, Regiones específicas.
- **Autorradiografía** que hace evidente el patrón de bandas y que consiste en exponer la membrana de nylon (ya hibridada) a una película sensible.

Dot Blot.

Mientras que southern blot proporciona información acerca de la presencia de un fragmento específico de DNA, y su tamaño relativo, el dot-blot se utiliza cuando sólo se está interesado en saber si una secuencia en particular está presente o no en una muestra. En esta técnica, se deposita un poco de DNA desnaturalizado en una membrana, se efectúa hibridación con una sonda marcada con anterioridad y un sistema de detección proporciona la respuesta en forma de una mancha, cuando se une la sonda a la secuencia blanco.^{5, 20, 23, 24}

Secuenciación del DNA.

Gran parte de la individualidad biológica está determinada a fin de cuentas por la secuencia del DNA genómico, así que la forma más directa (pero no la más eficiente) de observar los polimorfismos sería establecer su secuencia en un área lo suficientemente larga como para poder diferenciar a dos personas por la variación intermitente. Sanger en 1977, diseñó el método de secuenciación más popular y es una síntesis *in vitro*, donde se añade una pequeña cantidad de un dideoxinucleótido (A, G, C y T) que interrumpe la extensión de la cadena en los lugares donde se incorpore un dideoxinucleótido. De manera que las cuatro reacciones de

secuenciación (cada una con su respectiva marca radiactiva) permitirán determinar las posiciones de los cuatro nucleótidos en el fragmento que se esté secuenciando, según el patrón de bandas de cada uno, al ser sometidos en conjunto a electroforesis en un gel suficientemente largo, denominado de secuenciación. Hoy día, este método se efectúa de manera automatizada, utilizando marcadores fluorescentes y analizados por un lector láser.^{1, 2, 3, 21}

Sondas alelo específicas (PCR-sondas ASO).

Las sondas ASO (del inglés, allele specific oligonucleotide), detectan mutaciones, polimorfismos sencillos o ambos, por el cambio de sólo una base. Las sondas se encuentran fijadas a una membrana y reconocen alelos específicos al hibridar en condiciones controladas de temperatura y concentraciones de sal con el producto de PCR previamente marcado (con radiactividad, fluorescencia, etc.) La hibridación entre la sonda ASO y el amplificado indica los alelos o mutaciones presentes en el individuo.^{1, 2}

Esta técnica es muy utilizada para analizar polimorfismos sencillos por variaciones en un par de bases es la llamada PCR-sondas ASO o sondas alelo específico, que describe segmentos cortos de DNA fijos a una membrana que son capaces de reconocer alelos específicos cuando se someten a hibridación con el producto de PCR en ciertas condiciones de temperatura, salinidad, pH, etc. El hecho de que hibride con una u otra sonda, indica el alelo o los alelos presentes en el individuo para un *locus* específico.

Hoy día existen en el mercado diferentes sistemas basados en la PCR para lograr el perfil de DNA, entre los más utilizados están el VNTR D1S80 (Perkin Elmer Co.) y el sistema GenprintÓ (Promega Co.); este último logra analizar hasta ocho STR en una sola prueba; se puede aplicar un marcador no STR (Amelogenin) que permite definir el sexo por diferencia en el tamaño del amplificado según el cromosoma sexual. Existe otro marcador del sistema HLA llamado PolymarkerÓ, que mediante PCR-sondas ASO permite el análisis de seis polimorfismos al mismo tiempo.

Utilización de otras sondas para la identificación específica de DNA.

Volviendo a los fundamentos del análisis de paternidad por DNA, los primeros pasos se dieron cuando algunos investigadores que estudiaban el DNA del núcleo de células humanas, se percataron que al aplicar sondas de DNA conteniendo secuencias de bases específicas de algunos genes, que previamente fueron fragmentados por una enzima de restricción, era posible detectar diferencias individuales en muestras de DNA.⁵

Este fenómeno se manifestaba cuando los quizás millones de fragmentos que resultan de digerir con alguna enzima de restricción, el DNA cromosomal humano (que en la totalidad de los cromosomas abarca aproximadamente 3.000 millones de bases), son separados por tamaño en una electroforesis en gel de agarosa y luego transferidos a una membrana de nylon o nitrocelulosa, para enseguida someter a esta membrana a una incubación con la sonda de DNA que contiene marca radiactiva (generalmente ³²P).⁵

Después de estos procedimientos es posible ver una o más bandas al exponer la membrana tratada con la sonda a una placa radiográfica. Estas bandas representan los fragmentos cortados con la enzima de restricción que contienen secuencias de bases reconocibles por la sonda. Las diferencias en el DNA de un individuo respecto de otro, se hacen entonces visibles por variaciones en el tamaño de los fragmentos (bandas) que aparecen en la placa radiográfica. Las bandas que representan fragmentos de diferente tamaño ocupan distintas posiciones en la placa radiográfica. Ejemplos de estas diferencias individuales que pueden resaltarse se encuentran en una región que bordea el gen de la insulina, así como regiones del oncogen c-H-ras, y del gen de la alfa-globina.^{2, 5}

En principio, las variaciones en el largo de los fragmentos de restricción detectadas por las sondas a que nos referíamos anteriormente, pueden deberse

a mutaciones que conducen a la generación o eliminación de un sitio de corte por la enzima de restricción, o a la inserción o deleción de un segmento de DNA dentro del fragmento producido por la enzima de restricción.^{10, 12}

Se ha determinado que en la mayoría de los sitios del genoma (los denominaremos *loci* en plural, o *locus* en singular), es en donde se han observado estas variaciones, se trata de situaciones de inserción-deleción. En general, las variantes que, denominamos *alelos*, están dados por un número variable de cortas secuencias de bases repetidas en *tándem*. Para definir este tipo de alelos, Nakamura y colaboradores propusieron la denominación de Regiones en Tandem de Número Variable (*VNTR*), que es la abreviación inglesa de "*variable number of tandem repeats*" y que se empleó como marcador genético por mucho tiempo.¹

La aplicación de los VNTR a los problemas de determinación de paternidad se debe en buena medida al aporte de Alec Jeffreys, quien junto a sus colaboradores logró diseñar un par de sondas en donde cada una de ellas permite las detecciones simultáneas de alelos VNTR provenientes de varios loci.

El trabajo que condujo al desarrollo de estas sondas comenzó con el descubrimiento de una región del gen de la proteína mioglobina humana que contenía un segmento constituido por cuatro unidades repetidas de 33 pares de bases cada una. La Figura 1.2. muestra este segmento en el cual las unidades repetitivas fueron cortadas con la enzima de restricción Ava II, produciendo fragmentos de 33 pares de bases, que en rigor están constituidos por la "cola" de una unidad y la "cabeza" de otra.^{1, 2}

Los procedimientos de clonación que se describen a continuación forman parte de los recursos de la llamada *Ingeniería Genética* y tienen por objetivo poder incorporar, de manera muy dirigida, fragmentos de DNA de cualquier origen en

vectores o unidades de DNA de microorganismos, que permiten que este DNA "extraño" se reproduzca junto con estas unidades genéticas del microorganismo.

La Sonda pAV 33.7

Los fragmentos de 33 pares de bases que se mencionaban anteriormente fueron ligados con la ayuda de una enzima que actúa en sentido opuesto a las enzimas de restricción. Por estas reacciones de ligación de pequeños fragmentos es posible concatenar largas cadenas de unidades repetitivas.⁵

En la figura 1.2 se esquematiza la construcción de una sonda, utilizando como vector el plásmido pUC13, con unidades repetitivas en tándem por Jeffreys y col. Las cuatro unidades (flechas en tándem) de la parte superior, representan un segmento del gen de la mioglobina. Las líneas señalizadas con A en el tándem, aluden a pequeñas diferencias que tienen estas unidades respecto de las dos restantes y que consisten en la presencia de sitios de corte por la enzima de restricción Ava II. El segmento de 33 pares de bases que se genera al cortar con Ava II, fue ligado constituyéndose múltiples especies poliméricas y que en la figura 1.2 se representan como el monómero entre paréntesis con el subíndice n. Una cadena con n = 23 pudo clonarse en el plásmido pUC13, resultando el clon pAV33.7. En el círculo que representa este último plásmido, sólo se han hecho figurar la unidad 1 y la final (23) y con línea punteada, el espacio ocupado por las demás unidades ligadas de "cabeza a cola".⁵

Al emplear el plásmido pAV33.7 como sonda marcada con fósforo radiactivo para reconocer secuencias de DNA en una genoteca de 300.000 segmentos de DNA clonados en el virus *fago lambda L 47.1*, fue posible detectar unos 40 clones en los cuales existirían secuencias con algún grado de similitud con pAV 33.7. De estos 40 clones se eligieron ocho al azar para su estudio en detalle. En este estudio pudo encontrarse que los segmentos de DNA que eran reconocidos por la sonda, correspondían a tamaños de 200 a 2000 pares de bases, en

donde podían reconocerse unidades repetitivas diferentes en cada clon y cuyo largo variaba de 16 a 64 pares de bases.⁵

Estas unidades se repetían en tándem entre 3 y 29 veces. Al comparar la secuencia de las unidades de estos ocho clones pudo establecerse que existía como parte de todas ellas al menos una secuencia casi invariable o "core" de las siguientes 16 bases: GGAGGTGGGCAGGAXG (X representa una posición que puede ser ocupada por cualquier base). Se observará que hay una alta proporción de G, lo que es común a otros "cores" que han sido caracterizados con posterioridad.

Las Sondas 33.15 Y 33.6: El patrón individual de bandas.

La sonda pAV 33.7 está compuesta de unidades que contienen este core de 16 bases y 17 bases más que escapan de esta secuencia consensual. En opinión de Jeffreys, una sonda que sólo consistiera en un tándem de cores, podría producir híbridos más estables, por facilitarse la alineación entre la sonda y el DNA con las secuencias multicopia. La secuenciación de los ocho clones indicaba que tal situación se daba con las unidades repetitivas del clon 33.15; y, en efecto, cuando el DNA de este clon fue utilizado como sonda para reconocer fragmentos de DNA con secuencias análogas —después de digerir el DNA con una enzima de restricción como Hae III o Hinf I y separarlos por electroforesis— se observó que el DNA de cada individuo humano sometido a este análisis mostraba un perfil único compuesto de múltiples bandas dispuestas de un modo que recuerda los códigos de barras usados hoy con variados propósitos. Un panel de varios individuos fue también analizado por otra sonda obtenida de los ocho clones que se mencionaron anteriormente y que también estaba básicamente compuesta de cores. Esta sonda denominada 33.6 también reveló perfiles de bandas únicos para cada persona. Esta característica de patrón único para cada persona condujo a la designación de este análisis como DNA fingerprints (o impresión dactilar del DNA).^{1, 5}

La interpretación de estos patrones de bandas es que la sonda reconoce varios loci del genoma y que estos loci son polimórficos, es decir, que en cada locus hay varias posibilidades de alelos. La fundamentación de esta interpretación está en los resultados de Jeffreys que muestran que empleando ya sea la sonda 33.15 ó la 33.6 para analizar un grupo de individuos en condiciones de hibridación de alta estrictez, esto es, subiendo la temperatura y bajando la concentración de sales, se obtienen patrones de dos bandas acordes con lo que se espera si la sonda reconoce un solo locus en el cual hay dos alelos. Con la alta estrictez se consigue que la sonda permanezca unida al DNA sólo si se homologa a éste en tramos largos. Estos ensayos de alta estrictez permitieron detectar dos alelos en el locus definido por la sonda 33.15 y ocho alelos para el locus definido por la sonda 33.6. En este último caso se demuestra directamente que el locus es polimórfico.

Se ha establecido entonces que en determinadas condiciones, las sondas 33.15 y 33.6 actúan como sondas multilocus y, en condiciones de mayor estrictez, como sondas monolocus. Durante la década de 1980 se descubrieron varios loci que mostraban este tipo de polimorfismo y en Estados Unidos comenzaron a desarrollarse métodos comerciales de tipificación de DNA humano, fundamentalmente con propósitos forenses. Concretamente, las aplicaciones forenses consistían en determinar por medio del DNA con qué certeza una mancha de sangre -o semen en caso de violaciones- podía ser atribuida a un sospechoso. Los sistemas de tipificación que paulatinamente comenzaron a ser aceptados en las cortes de justicia consisten en "kits" que usan unas cuatro a cinco sondas monolocus diferentes.

Sobre la pregunta acerca de la probabilidad o "improbabilidad" que muestras de DNA de dos individuos diferentes resulten iguales en su composición de alelos para todos los loci que considere el "kit", podríamos anticipar cualitativamente que tal coincidencia será más improbable: a) mientras más loci se consideren y, b) mientras más alelos diferentes tenga cada locus.

Un supuesto fundamental para este cálculo es que para un locus dado los alelos se combinan al azar y, puesto que los alelos son heredados, implica suponer que las personas portadoras de estos alelos se aparean en forma aleatoria. De cumplirse esta y otras condiciones, se dice que una población está en equilibrio de Hardy y Weinberg.^{1, 2}

En tal caso la presencia de un alelo es independiente de la presencia de un segundo alelo y se puede calcular la frecuencia de un par particular de alelos que sencillamente es el producto de la frecuencia en la población de cada alelo (multiplicado por 2, ya que tiene la misma posibilidad de heredar cada alelo de ambos padres). La composición de los dos alelos de un locus se denomina el *genotipo* para ese locus y la frecuencia de un genotipo para una combinación de loci se obtiene multiplicando la frecuencia del genotipo para cada locus. Por ejemplo, si los genotipos en los loci A, B, C y D aparecen en un 10% de la población, entonces la probabilidad de que una persona presente estos genotipos en los cuatro loci es 0,1 multiplicada por sí misma cuatro veces: 0,0001.¹

Los laboratorios comerciales que han implementado estos grupos de sondas monolocus han recopilado datos poblacionales de frecuencias de alelos que como hemos visto resultan importantes para calcular las probabilidades que dos muestras de DNA den resultados coincidentes simplemente por azar. La aplicación de estos datos poblacionales ha despertado controversia entre algunos genetistas, quienes opinan que la distribución de alelos es muy dependiente de subgrupos existentes aun dentro de un grupo racial y que para hacer confiables estas estimaciones de frecuencia es aún necesario recopilar más resultados y estudiar la estructura de los grupos poblacionales elegidos como referencias.¹

Después del desarrollo de las sondas multilocus 33.15 y 33.6, han aparecido varias más, pero que con la tipificación de los STRs, dejaron de tener importancia.

En el caso de las sondas multilocus, el criterio que se ha ido imponiendo para la estimación de las probabilidades que dos individuos tomados al azar en una población dada tengan idénticos perfiles de DNA se basa en el parámetro X, que es la proporción de bandas que comparten en promedio pares de individuos no relacionados. En la determinación de X se registran sólo las bandas que corresponden a fragmentos de un tamaño que va de unas 2.500 bases a 20.000 bases. La razón para ignorar fragmentos más pequeños, es que en esa región del gel de electroforesis se produce una superposición de bandas correspondientes a alelos pequeños, así como a fragmentos producidos por cortes de la enzima de restricción al "interior" de alelos de algunos loci. También es posible que en esta región de fragmentos pequeños exista una mayor representación de loci monomórficos, lo cual contribuye a que el área de electroforesis donde se ubican estos fragmentos más pequeños, sea menos informativa.^{1, 2, 5}

El parámetro X para el rango de fragmentos más grandes ha resultado ser de 0,14 para las sondas 33.15 y 33.6 después de analizar una amplia casuística de comparación de individuos caucásicos. Esto significa que de las 17 bandas que se detectan en promedio con un tamaño entre 3,5 y 20 kilobases (kb), habría una coincidencia en la posición de dos a tres bandas entre individuos no emparentados. Suponiendo que las bandas de un perfil de DNA sean estadísticamente independientes, es decir, que no ocurra que las bandas se hereden como bloques de bandas, entonces la probabilidad que n bandas de un individuo A se encuentren en B es de X^n . Esto quiere decir que si un individuo tuviera 17 bandas, la probabilidad de que su patrón se repita en otra persona no emparentada es de $0,14^{17}$, o tres en cien billones. Aun aumentando la estimación de la frecuencia de bandas compartidas a 0,25, las probabilidades de que dos individuos no emparentados coincidan es remotísima.

Al describir las estadísticas de bandas compartidas en la población general, nos hemos referido reiteradamente a individuos no *emparentados*, por lo que se

advierde que la proporción de bandas compartidas está relacionada con el grado de consanguinidad. En efecto, los diferentes alelos de este sistema de loci se heredan en forma esencialmente mendeliana. El perfil de DNA de un individuo está formado por bandas aportadas en un 50% por cada progenitor, esto es, si, por ejemplo, en un individuo encontramos 19 bandas y hemos analizado en paralelo los perfiles genéticos de DNA de sus padres, veremos que la posición de unas 10 bandas es coincidente con bandas de la madre y las restantes son coincidentes con la posición de bandas paternas. Esta observación es la esencia del análisis de paternidad por el perfil de DNA: si el presunto padre no es el padre, compartirá con su presunto hijo una de cada 7 bandas en lugar de 1 de cada 2, como lo hace un hijo con su verdadero padre. El tipo de DNA detectado por las sondas 33.15 y 33.6 recibió la denominación de minisatélite por constituir versiones "abreviadas" (con menor número de repeticiones) del llamado DNA satélite que corresponde a segmentos de DNA con mil a una decena de millones de unidades repetitivas. El DNA satélite recibió este nombre hace ya mucho tiempo y se debe a que al analizar el DNA de células nucleadas por ultracentrifugación había segmentos que sedimentaban de modo diferente del resto del DNA. Con posterioridad pudo establecerse que este DNA de sedimentación anómala contenía una alta composición de las bases G y C y largos tramos constituidos por unidades repetitivas en tándem. Al descubrirse recientemente más tipos de DNA repetitivos adecuados para el análisis de los perfiles genéticos de DNA han ido apareciendo otros marcadores genéticos como los *microsatélites* o *secuencias repetitivas simples* como los STRs.^{1, 2, 5}

La Técnica MVR-PCR para el análisis de la variabilidad genética.

Finalmente presentamos otro ejemplo de nuevas tecnologías de exploración de los VNTR que, si bien no es de aplicación en paternidad, ilustra de manera muy interesante la muy activa innovación en la aplicación del análisis del DNA en las áreas forense y de genética de poblaciones. La técnica que describiremos a continuación se basa en la metodología de PCR que, como se indicó, tiene por

objetivo producir millones de copias de un segmento de DNA cuyo tamaño está determinado por secuencias que flanquean el segmento de interés.⁵

Esta técnica se la denominó como MVR-PCR (Minisatellite Variant Repeat Mapping via Polymerase Chain Reaction), y es un método para analizar la variabilidad genética examinando en un locus dado la composición interna de los alelos constituidos por dos tipos de unidades repetitivas llamadas A y T (no confundir con las bases A y T). Ahora no interesa el largo del alelo, dado por el número total de As y Ts, sino la secuencia particular de unidades A y T en cada uno de los dos alelos del locus, que en este caso se denomina locus D1S8. Esta ingeniosa aplicación de la PCR se desarrolló para determinar estas secuencias de A y T.

En la PCR "clásica" la doble hebra de DNA se separa en hebras simples, incrementando la temperatura y, a las secuencias flanqueadoras se unen los *primers* o iniciadores, iniciándose el proceso cíclico de multiplicación del fragmento de DNA. Los iniciadores se agregan a la reacción en gran exceso respecto del DNA que se desea amplificar.⁵

En MVR-PCR la reacción de amplificación se efectúa a una concentración alta de un iniciador que flanquea al VNTR, pero en condiciones de déficit de un iniciador que reconoce la unidad A. Se genera así una población de múltiples especies híbridas molde (DNA)-iniciador diferente. Cada especie tendrá asociado el iniciador que flanquea al VNTR y un "iniciador A" en cualquiera de las unidades A del alelo. Al efectuarse entonces la reacción de amplificación se obtendrán fragmentos de DNA que van desde el iniciador que flanquea (PF) hasta la primera unidad A; otros que van desde PF a la segunda unidad A; otros desde PF hasta la tercera unidad, etcétera.⁵

Debido a que el iniciador A se encuentra a una concentración muy baja y se agota rápidamente, la reacción de PCR para multiplicar a millones los fragmentos

de diferente largo se consigue gracias a que el iniciador A tiene, además de las 20 bases complementarias a la unidad A, una "cola" con una secuencia de otras 20 bases que sirven para hibridar otro iniciador (TAG) que se encuentra a altas concentraciones, de modo que con las grandes cantidades del iniciador PF y TAG se produce la verdadera amplificación.

Al analizar por electroforesis los productos de esta reacción de MVR-PCR se observa una escalera en que cada peldaño es un fragmento de ADN amplificado. La diferencia de tamaño de un peldaño con su inmediatamente contiguo es de 29 pares de bases. Cada cierto trecho de esta escalera falta un peldaño, lo que significa que un fragmento del tamaño correspondiente al peldaño que falta, no se amplificó por no haber hibridado el iniciador de tipo A con la unidad que ocupaba esa posición. Generalmente en esa posición se encuentra una unidad T y si se efectúa una amplificación siguiendo el mismo principio recién explicado, pero empleando un iniciador que reconozca la unidad T, se obtendrá una escalera "complementaria" a la anterior, es decir, aparecerán peldaños donde la escalera anterior tenía huecos. En realidad los patrones que se obtienen son algo más complejos por estar superpuestas las secuencias de unidades A y T de los dos alelos del locus. En todo caso, al comparar ambas escaleras siempre puede clasificarse lo observado en cada posición (peldaño) en uno de los siguientes cuatro casos:

Caso 1: Sólo se observa una banda intensa en la escala A, porque ambos alelos tienen una unidad A en esa posición.

Caso 2: Sólo se ve una banda intensa en la escala T debido a que ambos alelos tienen una unidad T en esa posición.

Caso 3: Hay bandas más tenues en la escala A y T, porque un alelo tiene una unidad A y el otro, una unidad T.

Caso 4: No hay bandas o peldaños en la escala A y T por existir en los alelos unidades "no A no T".

El caso 4 es escaso y la presencia de estas unidades es sólo de un 1,6% en una muestra de individuos caucásicos. Un individuo entonces puede identificarse con un *código* (ejemplo: 11233232313211...) y no por un patrón de electroforesis, que siempre debe ser repetida cuando se quiere hacer una comparación. El código numérico, en cambio, es inmutable y puede almacenarse en un banco de datos. Un estudio en 334 individuos mostró que no había dos personas con el mismo código al analizar 50 peldaños. En todos estos análisis se ha verificado que la mayor variación de la disposición de unidades A y T se concentra más hacia el extremo donde está la secuencia que reconoce el iniciador PF, lo que indicaría puntos de mayor recombinación que van generando nuevas secuencias. Hasta ahora el análisis de estos códigos ha permitido reconstruir un grupo importante de alelos, de los cuales una fracción significativa puede ser clasificada en 32 grupos. Fig.1.3.

El MVR-PCR consta de menos ciclos de amplificación que la PCR convencional, porque una multiplicación de los fragmentos logrados por MVR-PCR produce un "colapso" de la reacción, situación en la cual no se detectan fragmentos discretos de DNA, sino que una gama continua de tamaño que se ve como un chorro en la electroforesis. Dado que el grado de amplificación en MVR-PCR es discreto, no hay suficiente material para ver las bandas (peldaños) con una tinción para DNA. Por esta razón se recurre a visualizar los fragmentos separados por electroforesis, hibridándolos con una sonda radiactiva, que consiste en un fragmento de DNA clonado que contiene el segmento que va de PF a la primera unidad repetitiva, más varias unidades repetitivas (A y T).⁵

4.- El polimorfismo del DNA como base de la identidad genética.

En el DNA nuclear, los genes y las secuencias relacionadas con genes comprenden cerca de una quinta parte del DNA total, aunque menos de 10% de éste se codifica. De manera que gran parte del DNA nuclear es intragénico y no codificante (introones), o extragénico sin alguna función conocida. Parte de este DNA es de copia única, mientras que otra parte presenta gran número de

copias (secuencias repetitivas), que comprenden en total un tercio del genoma. Aunque la mayor parte de genes que codifican son únicos, existen algunos repetitivos con mayor o menor grado de diferencia que conforman familias de genes. La masa total de DNA no relacionado con genes, ya sea única, de pocas copias o repetitiva, es una fuente valiosa de polimorfismo genético, ya que puede introducir o mantener cambios en su secuencia, mientras no afecte alguna función que pueda impedir tales cambios. El DNA repetitivo puede subdividirse por la localización relativa de sus elementos como disperso y en tándem.^{2,6,8}

EL DNA porta la información que permite la transmisión genética exacta de los rasgos de una célula a las células hijas y de una generación a la siguiente, además su estructura primaria especifica la secuencia: aminoácidos de las cadenas polipeptídicas que conforman las proteínas.¹

El gen es la unidad de la información genética. En eucariotas la mayor parte de los genes consiste de secuencias codificantes llamadas exones, separados por regiones no codificantes o intrones. Cuando algún gen de un organismo superior va a ser expresado transcribe a partir del DNA, a una copia de RNA: tira sencilla en donde la timina es reemplazada por uracilo. Este transcrito primario de RNA con secuencias de intrones y exones se procesa para producir RNA mensajero (mRNA), que contiene únicamente las secuencias de los exones. Luego, los ribosomas aducen el mRNA para generar el polipéptido especificado, gracias a un código donde cada tres bases del mRNA, denominado codón, especifican para un aminoácido, lo que constituye el dogma central de la biología molecular.^{1,2}

En el DNA humano, y en la mayor parte de otros se pueden encontrar secuencias repetitivas que no se encuentran organizadas en tándem, pero están más o menos dispersas entre las secuencias únicas de DNA a lo largo del genoma. Los ejemplos clásicos son las familias de repeticiones Alu y Kpn, elementos nucleares dispersos cortos y largos conocidos como SINE (del inglés,

short interspersed nuclear elements) y SINE (del inglés, *long interspersed nuclear elements*), de manera respectiva.¹

La palabra **polimorfismo** (*poli*, muchas; *morfos*, formas), refiere la variabilidad de un rasgo o característica. En genética, un **locus** se define como polimórfico cuando al menos 1% de los cromosomas en la población tiene una secuencia diferente a la de mayor parte, aunque es importante destacar que esta definición refleja la existencia de variantes en un *locus* y no sus consecuencias funcionales. Los primeros polimorfismos genéticos descritos fueron proteínas, principalmente antígenos de membrana de células sanguíneas, como el sistema ABO y Rh, que se hacían evidentes gracias a sus propiedades bioquímicas como carga eléctrica, capacidad antigénica, etc.^{10, 12, 13}

La importancia del DNA se ha extendido por el descubrimiento de la extraordinaria variación en su secuencia, por ejemplo, existen datos que sugieren que cerca de 1 en 300 -1 000 pares de bases (pb) en el genoma humano es polimórfica y, como se podría esperar, su frecuencia es mayor en regiones no codificadoras que tienen poco o nulo efecto en la expresión génica. Sin embargo, el polimorfismo en el genoma va más allá de diferencias en un par de bases e incluye inserciones, deleciones y los minisatélites, que ahora es posible distinguir debido al desarrollo de las técnicas de genética molecular.¹²

5.- Identificación y características de los marcadores genéticos.

A finales del decenio de 1970, se comenzaron a utilizar regiones variables del genoma en zonas de DNA no codificadoras y que son polimórficas; existen varios tipos de secuencias, algunas de ellas de naturaleza repetitiva, como los VNTR (regiones con repeticiones en tándem de número variable) y los STR (repeticiones cortas en tándem) que son de los más utilizados y se encuentran dispersos en el genoma, cada uno de ellos con múltiples alelos.^{14, 15}

Entre las ventajas de los minisatélites y microsatélites se cuentan:

- Objetividad de que resultan perfectamente observables y los protocolos reproducibles.
- Variabilidad discontinua que permite diferenciar una variable de otra como unidades discretas.
- Herencia mendeliana simple asegurando la transmisión del marcador a la descendencia.
- Estabilidad ya que no se modifican por el ambiente, la edad o cuadros patológicos, lo cual evita cambios en los resultados.
- Analizables fácilmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*, PCR).
- Además, estos *loci* sirven en genética clínica como marcadores útiles para localizar genes relacionados con enfermedades. Los polimorfismos moleculares han permitido que en la actualidad el Proyecto del Genoma Humano (PGH) haya generado detallados mapas genéticos del genoma humano a un nivel de resolución cercano a 1 centimorgan (cM) o menor. Esto ya se logró en 1994, un año antes de lo previsto, y en buena parte con resoluciones mejores (0.7 cM).²³

Características de los minisatélites y de los microsatélites.

Tipo de repetición (pb): minisatélite VNTR

Grado de repetición (por *locus*) 10-103

Número de *loci*: miles por genoma.

Tamaño de la repetición: 7-100.

Tipo de repetición: Microsatélite STRs.

Grado de repetición (por *locus*): 10-102

Número de *loci*: Hasta 105 por genoma según la repetición.

Tamaño de repetición: 1-6.

Capítulo II.- El laboratorio de Genética Forense.

El laboratorio de genética forense es una organización encargada de la caracterización de DNA en material biológico seleccionado y asociado con investigaciones civiles y penales. Tiene por objetivo establecer relaciones biológicas entre personas: paternidad, maternidad y otros vínculos familiares e

identificar a personas: en casos de individuos desaparecidos, identificar víctimas y victimarios a través del análisis de vestigios; investigar casos de violación simple o con muestras mezcladas (violación múltiple), y en el estudio de hechos relacionados con la medicina forense.²³

1. De los requerimientos.

Un laboratorio de genética forense responde a los siguientes criterios:

- Nivel elevado de conocimientos y competencia profesional.
- Integridad profesional y científica.
- Seguridad adecuada en sus instalaciones.
- Confidencialidad absoluta.

2. De los peritos forenses.

Es considerado perito forense el jefe o coordinador del LGF y el experto en un área específica de la ciencia forense que debe cumplir con los requisitos expuestos a continuación:

-Requisitos académicos: Tener grado de Doctor en una ciencia biológica, entrenamiento y experiencia en pruebas de paternidad, o tener educación universitaria, comprobable a una maestría en genética humana y al menos 3 años de entrenamiento en pruebas de paternidad con supervisión de un experto. El DNA Advisory Board/FBI exige una Maestría en biología, química o áreas relacionadas a las ciencias forenses u horas créditos en bioquímica, genética, biología molecular, estadística y genética de poblaciones. Otros organismos como el GEP-ISFG solicitan poseer al menos el grado de licenciado, con conocimientos acreditados en bioquímica, genética de poblaciones y garantía de calidad y un trabajo mínimo en genética forense de al menos 3 años.²³

Son también evaluados en el experto en genética forense los reconocimientos recibidos en la especialidad, las publicaciones en eventos científicos y en revistas

arbitradas, membresías en sociedades científicas de la especialidad, haber realizado pruebas de suficiencia, tener una trayectoria moral y ética comprobada en el ejercicio profesional.

3. De la seguridad del personal

Definición: Se entiende por Bioseguridad al conjunto de normas y medidas preventivas establecidas con el único fin de asegurar la salud y la vida del personal de laboratorio que enfrenta riesgos procedentes de diferentes agentes biológicos, físicos y químicos, protegiendo también de esta manera a toda la comunidad y medio externo que rodea el sistema de trabajo de un laboratorio.

Estas normas comprenden tres etapas:

- 1) Identificación del riesgo.
- 2) Prevención.
- 3) Protección.

1) Identificación del Riesgo.-

Los agentes de riesgo identificados o asociados con cualquier ambiente de laboratorio son:

- a) Biológicos
- b) Físicos
- c) Químicos

a) Biológicos:

Agentes microbiológico:

Para el organismo humano el riesgo es potencialmente elevado ya que los mismos pueden ingresar por varias vías, como por inhalación, ingestión o autoinoculación, grietas en la piel, mucosas, etc. Los agentes microbiológicos pueden ser transmitidos de diversas formas como:

- Insectos contaminados, se debe evitar su presencia en cualquiera de las áreas del laboratorio, pues se ha comprobado que se constituyen en un medio de transporte para las bacterias.
- Pelos y diferentes desechos contaminados procedentes de animales de experimentación infectados.
- Las plantas de interior también pueden originar estos riesgos potenciales y deben ser controlados cuidadosamente para detectar cualquier signo de infestación, si es que no se las excluye por completo del ambiente de laboratorio.

b) Físicos:

- Riesgos eléctricos que tienen origen en equipos defectuosos.
- Temperaturas elevadas.
- Incendios.
- Ruidos excesivos.
- Radiaciones por rayos X, rayos gamma, luz ultravioleta, químicos radiactivos (bromuro de etidio) y otros.

c) Químicos:

Asociados a sustancias de naturaleza:

- Tóxicos
- Corrosivos
- Carcinogénicos

- Inflamable
- Explosivos

d) Otros:

A todos estos riesgos también se asocian situaciones como ser:

- Pisos deslizantes
- Sistemas de circulación de aire deficientes
- Peligros dependientes de desastres naturales

2) PREVENCIÓN:

Para aplicar las diferentes medidas de prevención y protección es necesario tener muy bien identificados los diferentes riesgos del laboratorio, así como de su naturaleza y procedencia. Es así, que se deben seguir las diferentes normas frente a agentes de riesgo biológico como ser:

-Material Humano: se debe tener cuidado con todo referente a sangre, líquidos orgánicos, secreciones, tejidos, células, etc. Ya que deberán ser tratados como fuente potencial de infección para diferentes enfermedades como el SIDA, hepatitis, chagas, etc.

-Aerosoles: Que se constituyen en las pequeñas partículas producidas en la mayoría de las actividades laborales y que por su tamaño son difíciles de ser detectadas y se desplazan fácilmente por el ambiente poniendo en riesgo de esta manera todas las áreas por donde puedan transitar. Para evitar su formación y reducir estos riesgos se debe seguir las siguientes medidas:

- Mantener tapados o cerrados frascos y tubos.
- No soplar la última gota de la pipeta.

- Tener cuidado al descartar líquidos.
- Reducir en lo posible el tiempo de permanencia en la proximidad de la fuente de aerosoles.

- **Toma de Muestra:** Se constituye en la labor más importante y cuidadosa que debe realizarse. Una de las más importantes la constituye la toma de sangre, durante la misma se debe evitar el derrame de gotas de sangre; evitar punciones accidentales con agujas usadas al ser reinsertadas en su capuchón, para lo cual se recomienda el uso de una pinza en lugar de realizar la operación con la mano.

3) PROTECCIÓN:

A nivel personal: Para que el trabajo en el laboratorio se desempeñe adecuadamente de forma óptima es necesario seguir las siguientes normas básicas:

1. Todo el personal de laboratorio deben usar mandil con el propósito de no contaminarse.
2. El personal femenino deberá llevar el cabello recogido, o usar un gorro para el cabello, porque de lo contrario se expone a contraer cualquier tipo de infección e infectar a quienes lo rodean, al constituir el cabello un vehículo de diseminación para cualquier agente. La misma recomendación se hace extensiva para el personal masculino que lleve el cabello largo. En las ciencias forenses los cuidados son aun mayores, para no contaminar las muestras o evidencias.
3. Esta terminantemente prohibido ingerir alimentos, bebidas, o fumar en el laboratorio.
4. Se debe evitar el llevar las uñas crecidas, ya que las mismas se constituyen en óptimos depósitos de microorganismos.
5. Se debe evitar el uso de anillos, relojes y otras joyas; pues las mismas se constituyen en un medio de transporte de diferentes agentes.

6. Se debe tener la precaución de no llevarse las manos a la cara, boca, ojos, etc., evitando de esta manera la autoinoculación de diferentes agentes.
7. En casos necesarios (disección de animales) se debe emplear barbijos o mascarillas, guantes, lentes u otros accesorios para protección.
8. Se deben lavarse las manos cuidadosamente con un jabón desinfectante antes y después de cada trabajo de laboratorio.
9. No se debe colocar alimentos u objetos de uso personal en áreas del laboratorio evitando así su contaminación.
10. Obedecer avisos (señalización) sobre riesgos biológicos y otros, así como instrucciones escritas o verbales.
11. Esta totalmente prohibido el ingreso de niños al laboratorio.

A nivel del ambiente:

1. Se debe tener cuidado de mantener la limpieza de los mesones de trabajo, pisos, aparatos (estufas, autoclaves, equipos de ventilación, microscopios, centrifugadoras, etc.)

Para ello se recomienda como norma, que una vez concluida la jornada, debe procederse al lavado del mesón con agua y detergente, luego el secado con un material destinado exclusivamente para dicho fin. El caso necesario utilizar una solución de hipoclorito de sodio.²⁵

4. De las muestras biológicas e indicios.

La recogida y manejo de las muestras debe estar a cargo de personal entrenado con conocimientos técnicos y experiencia adecuada en la recogida de muestras. Se deberán considerar los siguientes aspectos en la toma y remisión de las muestras:

- Protección del personal.
- Protección de la muestra o indicio.
- Empacado.
- Identificación del caso, muestra y víctima.

-Cadena de custodia.

-Recepción adecuada de las muestras y la duplicación para casos de contraperitaje.²³

5. Comunicación de resultados.

En cuanto a la comunicación de los resultados se intenta educar al juez sobre el fundamento y detalles de la prueba genética. Se debe proveer al juez sólo la información esencial para comunicarle sobre la confiabilidad del método de prueba y la significación de los resultados. Se recomienda la presentación de los resultados a través de diagramas o gráficos explicativos.

El reporte de los resultados presenta el siguiente esquema:

-Identificación del laboratorio.

-Identificación del solicitante.

-Personas, tipo de muestra y loci analizados.

-Detalle del procedimiento técnico utilizado.

-Resultados obtenidos.

-Interpretación de los resultados según cálculos estadísticos.

-Responsable del estudio.

-Demostración de su acreditación.²³

6. De los programas de garantía de calidad de los laboratorios de genética forense.

Los programas de garantía de calidad establecen normas para definir los requerimientos que un laboratorio debe cumplir para asegurar la calidad, la integridad y la seguridad de la pericia y establece las cualidades de los expertos que actúan en la realización de las pericias.^{2, 23}

A través de la estandarización de la prueba de DNA se debe unificar métodos, elaborar las directrices comunes para las pericias, establecer las condiciones

académicas y éticas de los peritos y expertos, coordinar las investigaciones y facilitar la formación de especialistas en el área. Los estándares se pueden clasificar en los siguientes grupos: ^{2, 23}

- Estándares técnicos: que comprende el o los tipos de marcadores, la nomenclatura, la metodología de análisis, la valoración estadística, la redacción y la comunicación de resultados.
- Estándares de procedimientos: Aquí se consideran los elementos para obtener la acreditación del laboratorio de genética forense (LGF), mediante un Sistema de Gestión de Calidad. Se deben elaborar los protocolos y manuales del laboratorio, necesarios para la aplicación de las técnicas, el calibrado y mantenimiento de equipos, los controles de calidad internos y externos, las auditorias, etc.

En los programas de garantía de calidad se debe considerar la organización interna del laboratorio, la evaluación de competencia a sus profesionales, técnicos y personal de apoyo, la validación de los procedimientos, la estandarización de los procedimientos técnicos, las condiciones óptimas de las instalaciones, la interpretación adecuada de los resultados, el manejo de las muestras, equipos, materiales y reactivos, la comunicación de los resultados y las auditorias.²³

Existen organismos internacionales dedicados al control de calidad de los LGF, como el TWGDAM: Guidelines for a Quality Assurance program for DNA análisis (1991) y el DNA Advissry Borrard proposed Standard Quality Assurance Standard for forensic DNA testing laboratorios (1996); encargados de evaluar los requerimientos más relevantes en un laboratorio de genética forense, que comprende los siguientes ítems: de los laboratorios, del personal, recogida y manejo de las muestras, marcadores genéticos a utilizar y procedimientos para su estudio, interpretación de los resultados y la comunicación de los resultados encontrados.^{5, 23}

Los laboratorios deben cumplir los siguientes requisitos para su acreditación internacional:

- Los LGF deben ajustarse a los requerimientos de las normas ISO 17025: 2005.
- El laboratorio puede participar en ensayos de aptitud internacionales (control de calidad interno y ensayo de aptitud), al menos dos veces al año, para conservar su acreditación.
- Establecerá y documentará las acciones correctivas en casos de fallas en los ensayos de aptitud.
- Debe realizar auditorias anuales para verificar su conformidad con el sistema de gestión y la norma de referencia ISO 17025: 2005.

7. Aplicaciones de la prueba de DNA en el campo forense.

La prueba de DNA se aplica en la determinación de vínculos biológicos entre individuos y en el análisis de vestigios biológicos de interés en criminalística con los siguientes objetivos: determinar vínculos biológicos, confirmar o refutar evidencias en hechos delictivos, exculpar o inculpar individuos relacionados con un crimen, confirmar crímenes seriados, identificar restos humanos, confirmar la identidad en casos de fraudes en pólizas de seguros, determinar si múltiples individuos están vinculados a un mismo hecho criminal, determinar si se ha incurrido en errores de muestreo y otras aplicaciones.

La prueba de DNA se realiza en las siguientes etapas:

- Análisis y caracterización de muestras, donde se establece el perfil de identidad genético.
- Comparación de los resultados.
- Valoración probabilística.
- Emisión del informe de pericia ante las instancias judiciales.^{12, 13}

CAPÍTULO III. MARCADORES GENÉTICOS. IMPORTANCIA ANTROPOLÓGICA Y BIOMÉDICA.

1. INTRODUCCIÓN.-

El interés por el estudio de los marcadores genéticos humanos nació con el descubrimiento de los grupos sanguíneos del sistema ABO por Landsteiner en 1901. Su empleo en algunas poblaciones (europeas, árabes, africanas e hindúes) se realizó en 1919, donde se observó una variedad de proporciones de los grupos A y B, encontrando que los ingleses tenían mayor prevalencia del grupo A y los hindúes del grupo B.^{1,4}

A mediados del siglo XX, Smithies describió las variantes de proteínas séricas y eritrocíticas reveladas por electroforesis en gel de almidón, método que permite separar las moléculas de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. El método fue aplicado por Harris en el estudio de las enzimas intracelulares, ampliando notablemente el horizonte de estas investigaciones.¹

Excepto en los gemelos monocigotos, en el resto de los individuos existe una gran variabilidad bioquímica y genética. Éste fue uno de los primeros datos que se pusieron en evidencia, sobre todo porque se observa una diferencia importante entre los distintos grupos humanos, hecho que ha servido para caracterizar a las poblaciones. Los marcadores genéticos (distribución de grupos sanguíneos, de variantes de proteínas séricas, etc.) tienen varias ventajas sobre las características que tradicionalmente se han usado (color de piel, tipo de cabello, etc.) para fines taxonómicos en nuestra especie, porque cumplen con los siguientes requisitos: 1) el ambiente interviene poco en su expresión; 2) permanecen sin cambio durante toda la vida de los individuos, y 3) se conoce bien su modo de herencia, que en general es de tipo mendeliano simple.^{1,2}

Los marcadores de importancia antropológica y de aplicación en la genética forense, son polimorfismos genéticos, donde la frecuencia del fenotipo más raro se encuentra en más de 1% de la población. Esta definición excluye a muchos

sistemas génicos de gran interés en medicina, como los errores congénitos del metabolismo, cuya frecuencia en ningún caso es superior a 1 %.

La ley de Hardy-Weinberg explica el comportamiento de los genes en las poblaciones, y prueba dos cosas: 1) independientemente de qué tan raro sea el homocigoto para un gen, la proporción de heterocigotos es demasiado elevada, y 2) la frecuencia de los genes permanece inmutable a través del tiempo. Para que se cumplan estos postulados, es necesario que haya panmixia (esto es, que cada individuo de la población tenga la misma posibilidad de aparearse y tener descendencia sin tomar en cuenta el genotipo), y que los genes en cuestión no estén sometidos a la acción de fuerzas selectivas como selección natural, mezcla génica o deriva génica. En la práctica es difícil que estos postulados se cumplan en su totalidad, aunque las desviaciones no invalidan su aplicación.^{1, 2, 6, 20}

AA	Aa
Aa	aa

Figura 3.1. Relación que guardan los diferentes genotipos entre sí.

Para facilitar la explicación de esta ley se dará el ejemplo más sencillo: el de alguna característica determinada por un par de genes alelos A y a, que da lugar a tres genotipos posibles: AA, Aa y aa. A la frecuencia de A se denomina p, a la de a, q y la de Aa pq. La suma de la frecuencia de A (p) más la de a (q) siempre será 1, al igual que la suma de los tres genotipos (AA, Aa y aa).

Una muestra de la aplicación que tiene esta ley se nota en el cálculo de la frecuencia de heterocigotos en un padecimiento con herencia autosómica recesiva, como es la fibrosis quística. Se sabe que la prevalencia del padecimiento es de 1:2000 recién nacidos vivos; este dato corresponde a q^2 y el resultado de

$q = 1:44$; por tanto, la frecuencia de los heterocigotos ($2pq$) es $1:22$. Este dato se representa en la figura 3.2, donde se indica el primer postulado de la ley de Hardy-Weinberg.^{1, 23}

aa	Aa
Aa	AA

Figura 3.2. Frecuencia de homocigotos para un gen de baja proporción en la población.

El estudio de los polimorfismos genéticos tiene aplicación en diversas áreas del conocimiento. En medicina se puede citar la repercusión de los grupos sanguíneos en las transfusiones de sangre; su trascendencia en los trasplantes de órganos, junto con otros marcadores, como los antígenos de histocompatibilidad; su uso en medicina legal para la investigación de exclusión de paternidad; su utilización para estudios de vinculación con enfermedades, y en el diagnóstico prenatal de algunas enfermedades.

Los polimorfismos que describimos son los más importantes y reflejan el estado actual del conocimiento. Los polimorfismos que se describen son antígenos de membrana eritrocitaria, como los grupos sanguíneos de los sistemas ABO, Rh-Hr, MNSs, Duffy, P, Diego, Secretor, Lutheran, Kidd y Kell; antígenos de membrana leucocitaria, es decir el sistema HLA; proteínas intraeritrocitarias como la hemoglobina, glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa y la fosfatasa acida; proteínas séricas, como el sistema Gm, el componente de grupo específico Gc, albúminas, transferrinas y haptoglobinas, y 5) polimorfismos del DNA nuclear y mitocondrial.^{1, 2, 4}

Con frecuencia se mencionará al locus, sitio cromosómico que ocupa el gen que codifica para determinado marcador; cada cromosoma tiene un brazo corto denominado p y uno largo llamado q. En ambos brazos es posible, mediante tinciones especiales, observar unas bandas transversales que se identifican con número e indican su posición exacta en el cromosoma. Estos datos fueron recopilados por McKusik (1994).

2. ANTÍGENOS DE MEMBRANA ERITROCITARIA

GRUPOS SANGUÍNEOS

Los grupos sanguíneos son sistemas de antígenos localizados, casi todos, en la superficie de los glóbulos rojos, y algunos en fluidos corporales; se detectan por reacciones de aglutinación con antisueros conocidos o combinados con células testigo.^{1,2}

Sistema ABO

El sistema ABO fue descubierto por Landsteiner a principios del siglo XX, al mezclar los eritrocitos de unos individuos con el suero de otros y observar los distintos tipos de aglutinación producida, debido a la presencia de anticuerpos naturales del sistema ABO en el suero sanguíneo. Éste constituye el primer ejemplo de diferencias antigénicas heredadas reconocidas como tales en el hombre. El sistema ABO está formado por tres alelos conocidos como A, B y O, y su locus se ubica en el cromosoma 9q3.3-qter. Los genes A y B codifican para enzimas que agregan una molécula de azúcar: una N-acetil D-galactosamina en el primer caso, o una D-galactosa en el segundo. El gen O no codifica para ningún antígeno conocido.^{1,2,5}

Los antígenos A y B se encuentran principalmente en la membrana de los eritrocitos y se detectan con antisueros conocidos. Por lo general, los individuos con grupo sanguíneo A tienen anticuerpos contra B, los de grupo sanguíneo B tienen anticuerpos anti-A, y los de grupo O tienen anticuerpos anti-A y anti-B. (cuadro: 3.1).

Fenotipo	Genotipo	Antígeno	Anticuerpo
O	OO	Ninguno	Anti A y Anti B
A	AA, AO	A	Anti B
B	BB, BO	B	Anti A
AB	AB	A, B	Ninguno

Cuadro 3.1. Correspondencia de fenotipo, genotipo, antígenos y anticuerpos en el sistema ABO

Los antígenos A y B se forman a partir de una glucoproteína básica común llamada sustancia H, producto del gen H, localizado en el cromosoma 19q13-1-13.1.1. El alelo de H es el gen h, y los individuos homocigotos (hh), que son la mayoría en nuestro país, no producen el antígeno A o B a pesar de tener el gen correspondiente.

Existen variantes del gen A; las más comunes son A1 y A2; la primera es la más frecuente en la mayor parte de las poblaciones, La frecuencia relativa de los cuatro fenotipos del sistema ABO varía de manera sistemática en los diferentes grupos humanos, por lo que es de gran interés en el estudio de poblaciones. En el cuadro 3.2 se muestran las frecuencias génicas de este sistema en seis grupos humanos. Como se observa, la frecuencia más alta corresponde al alelo O en todos los casos, con límites que van de 57.2% en asiáticos, hasta 95.3% en indígenas mexicanos, y el menos frecuente es el alelo B, con límites entre 17.0 y 1.3% en las mismas poblaciones. Algunos datos de *n* no se encuentran debido a que no aparecen en la referencia de Krieger (1965) y, por tanto, tampoco se puede calcular el error estándar. Cuando se conoce *n* el error estándar se calcula según la fórmula $E. E. = \sqrt{pq/2n}$, en donde *p* y *q* son las frecuencias de los alelos y *n* es el tamaño de la muestra.^{1,2,5}

Población	Frecuencias génicas				
	A1	A2	B	O	N
Blancos	.204	.064	.068	.664	-
Negros	.255	.003	.170	.572	-
Asiáticos	.111	.061	.144	.684	-
Mestizos mexicanos	.130	.130	.049	.821	2794
Mestizos de las costas	.137	.137	.058	.805	642
Indígenas mexicanos	.034	.034	.013	.953	5385

Cuadro 3.2. Frecuencias génicas del sistema ABO en seis grupos humanos.

Sistema Rh-Hr

El sistema de Rh-Hr está constituido por los genes C, c, D, E y e, que codifican para los antígenos C, c, D, E y e. Desde el punto de vista médico, el más importante es

el D, por ser el más antigénico, y por ser la incompatibilidad materno-fetal para este elemento la causa principal de la anemia hemolítica del recién nacido. El descubrimiento de este antígeno lo realizaron Landsteiner y Wiener en 1940, y su identificación, así como la de los otros antígenos del sistema, se logra mediante el uso de anticuerpos específicos. Los genes del sistema Rh-Hr se encuentran en el cromosoma 1p36.2-p34, en el orden 1pter-D-C-E cen (cen = centrómero).

La combinación de los *loci* de este sistema da como resultado ocho posibles tripletes: CDE, CDc, CdE, Cdc, cDc, cDE, cdE y cdc, todos descritos. Los más comunes en las poblaciones son CDE, CDc, cDE, cDc y cdc, a los cuales también se les denomina como Rz, RI, R2, R0 y r, respectivamente. Debe tenerse presente que algunos fenotipos pueden corresponder a varios genotipos, por ejemplo, el fenotipo C+, c+, D+, E+ y e+ puede observarse en un individuo cuyo genotipo sea CDE/cde, CDe/cDE, CDe/cdE o Cde/cDE. Es imposible conocer en una misma persona el genotipo real, pero en una población sí se puede investigar la frecuencia más probable de cada uno de estos cromosomas de acuerdo con ciertas leyes matemáticas. Existen algunos antígenos poco frecuentes de este sistema, por ejemplo CW, con una frecuencia de 1% en población europea, y el Du, que es un antígeno débil existente en casi todas las poblaciones. La combinación cD^ue es típica de las poblaciones negras, y la Cdc se observa en poblaciones europeas y pocas veces en amerindias, por lo que se usa para calcular la mezcla no indígena en grupos mestizos; el antígeno V está genéticamente ligado al sistema Rh-Hr, y es un buen marcador africano, ya que sólo se observa en poblaciones negras.¹

Sistema MNSs

El sistema MN fue descubierto por Landsteiner y Levine en 1927, y el sistema Ss por Walsh y Montgomery en 1947. El antígeno N es precursor de M y la acción del gen M es agregar un grupo N-acetil neuramínico a la glucoproteína a del producto del gen N para dar el antígeno M. Además, los antígenos M y N difieren en dos aminoácidos correspondiente a las posiciones 1 y 5 amino terminales, que son Ser y

Gli en M, y Leu y Glu en N. La diferencia entre los antígenos S y s reside en un grupo metionina cambiado por treonina en la posición 29 de la glucoproteína. Los genes que codifican para este sistema se localizan en el cromosoma 4q28-q31. Los alelos más frecuentes en todos los grupos son el M, con una variación entre 54.8% en blancos y asiáticos, y 73.5% en indígenas mexicanos, y el s con límites entre 62.2% en mestizos mexicanos y asiáticos.^{1,5}

Sistema Duffy

Esta constituido por los antígenos Fy(a) y Fy(b) codificados por los genes Fy^o y Fy, localizados en el cromosoma 1q21. Los descubrieron Cutbush (1950) e Ikin y Mourant (1951). Además, Nichois informó de una nueva especificidad de Duffy denominada FyO. Este sistema es útil en antropología porque permite detectar a los individuos Fy(a-b-), fenotipo característico de la población negra, quienes son homocigotos para un gen silencioso denominado Fy. Los amerindios tienen, con mucha frecuencia, el fenotipo Fy(a+), que se ha relacionado con la susceptibilidad a contraer paludismo por *Plasmodium vivax*, ya que es el receptor de membrana de este parásito, y su ausencia en negros explica la resistencia de estos últimos a padecer dicha enfermedad.^{1,5}

Sistema P

Fue descubierto por Landsteiner y Levine (1927) simultáneamente al sistema MN, estos investigadores informaron la existencia de los alelos p¹ y p². Mediante estudios inmunoquímicos, Naiki y Marcus (1975) sugirieron que estaban codificados por *loci* diferentes. Marcus (1976) demostró que el antígeno P2 es un glucoesfingolípido de la serie globósido, codificado por el cromosoma 6. El antígeno P1 es de la serie paraglobósido; lo codifica el cromosoma 22q11.2-qter y presenta varios alelos: p. Ti^a, Ti^b. Svandorg (1976) demostró que el antígeno P1 es receptor para bacterias, en particular *Escherichia coli*. Y las personas que lo poseen tienen mayor susceptibilidad a infecciones del tracto urinario que aquellas con antígenos p o P2.^{1,2,5}

Sistema Kidd

Su descubrimiento lo realizó Alien (1951) al estudiar a un recién nacido con anemia hemolítica, cuya madre tenía anticuerpos contra dicho antígeno (Jk^a). Está constituido por los alelos Jk^a y Jk^b , situados en el cromosoma 18q11-q12, y se expresan desde la décima semana de gestación.^{1, 2, 5}

Sistema Kell

El antígeno K fue descubierto por Coombs (1946), y el k por Levine (1949). El gen se encuentra en el cromosoma 7q33 y está constituido por lo menos por tres pares de alelos ligados denominados K, k; Kp^a , Kp^b y Js^a , Js^b . En casi todos los estudios de genética de población sólo se han investigado los antígenos K y k.¹

Sistemas secretor y de Lewis

La capacidad que tienen algunas personas de secretar antígenos del grupo sanguíneo ABO por saliva y otros fluidos está determinada genéticamente por el gen secretor, que consta de los alelos Sc y sc que se han ubicado en el cromosoma 19. El fenotipo secretor lo tienen los individuos ScSc y Scsc, mientras que los homocigotos para sc tienen el fenotipo no secretor. De esta manera, los individuos secretores del grupo sanguíneo A secretan antígeno A, los de grupo B secretan antígeno B y los del grupo O secretan antígeno H, que es precursor de A y B.¹

El sistema de Lewis fue descrito por Mourant (1946) y está estrechamente relacionado con el sistema ABO y secretor. Los genes Le y le se encuentran en el cromosoma 19, bandas p 13.1 y q13.11. Los antígenos de este sistema están en plasma, saliva, entre otros fluidos, y los antígenos detectados en eritrocitos son adsorbidos del plasma. El producto del gen Le^a es el antígeno Le^a que en presencia del gen Se se convierte en Le^b . La presencia del gen H es necesaria para la síntesis del primer antígeno, pero no para el segundo. El producto del gen le es el antígeno Le^c , que se convierte en Le^d en presencia del gen Se.^{1, 13}

Lo complicado de este sistema y la relativa debilidad de los anticuerpos usados para detectar los antígenos, hace que los resultados sean poco fiables, además de que varias investigaciones se obtuvieron del estudio del antígeno Le^a en eritrocitos, en lugar de determinarlos en saliva, como es lo recomendable.

Sistema Diego

El antígeno Di(a) lo descubrió Layrisse (1955) al estudiar a un niño con eritroblastosis fetal. Está codificado por el gen Di^a, ubicado en el cromosoma 17q21-q22. La cifra más alta de este antígeno lo han descrito en amerindios sudamericanos, en donde algunos grupos tienen hasta 0.17 de frecuencia génica, pero está ausente en grupos blancos y negros, por lo que es un excelente marcador de poblaciones amerindias.¹

3. ANTÍGENOS DE MEMBRANA LEUCOCITARIA

SISTEMA HLA O COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

Es el Sistema de antígenos de membrana celular más complicado en el hombre, Esta constituido por más de 10 *loci*, con un número variable de alelos, cada uno de ellos se hereda en forma autosómica codominante. A la combinación de una serie de alelos en un cromosoma se le llama haplotipo para el sistema HLA, y combinado con el sistema complemento se denomina complotipo. El complejo HLA está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupa una región de 4000 kb. Consta de varios loci, los cuales se agrupan en tres regiones denominadas clase I, clase II y clase III.^{1, 5}

En la región I se han identificado los loci HLA A, HLA B, HLA C, HLA E, HLA F, HLA G y HLA H. Estos loci codifican para la síntesis de los antígenos correspondientes. Los antígenos HLA clase I están constituidos por una cadena polipeptídica de 44 kd, que corresponden al producto de los loci clase I. Este polipéptido se asocia en forma no covalente a una pequeña proteína de 12 kd, la

B2 microglobulina (cuyo locus está en el cromosoma 15), para constituir la molécula clase I activa.

Los antígenos HLA A, B y C se expresan en todas las células nucleadas del organismo; en tanto los antígenos E, F, G y H se expresan solamente en algunas etapas del desarrollo fetal.^{1, 5}

La región clase II contiene numerosos loci, de los cuales los loci DR, DP y DQ son los más comúnmente estudiados. Estos loci codifican para la síntesis de dos cadenas polipeptídicas denominadas (33 kd) y (28 kd), de manera que la molécula HLA clase II está constituida por dos cadenas polipeptídicas, una cadena α y una cadena β unidas no covalentemente. Estas moléculas clase II tienen una distribución tisular más restringida que las moléculas clase I, encontrándose solamente en las células presentadoras de antígenos tales como macrófagos, linfocitos T activados, linfocitos T cooperadores, linfocitos B y células endoteliales.

La región III incluye a los genes que participan en la síntesis de los factores del complemento como son C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor Bf de la vía alterna. Intercalados entre C4A y C4B se hallan los genes que codifican para la expresión de la enzima 21 hidroxilasa.^{1, 5}

Cada uno de los loci HLA tiene numerosos alelos, los cuales se heredan en forma mendeliana codominante. Cada alelo codifica para la síntesis del antígeno correspondiente. Los antígenos se denominan con la letra del locus y un número; ejemplo: A1, A2, B5, B12. Los alelos respectivos se identifican con la letra del locus, un asterisco y un número; ejemplo: A*0101; A*0201; B*0502. Utilizando métodos serológicos, se han identificado 158 antígenos HLA diferentes, que se distribuyen como sigue: 27 HLA A, 59 HLA B, 10 HLA C, 24 HLA DR, 26 HLA D, 9 HLA DQ y 6 HLA DP. Sin embargo, utilizando métodos moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o secuenciación de genes HLA, se ha demostrado que la variación alélica es mucho mayor.^{1, 5}

Cada persona expresa dos antígenos por locus y por lo tanto tiene dos alelos, los cuales pueden ser diferentes si la persona es heterocigoto, o bien ser iguales si la persona es homocigota. Así, un individuo puede tener como máximo 12 alelos diferentes para los 6 loci HLA que estamos considerando (A, B, C, DR, DQ y DP).¹

Finalmente debido a que la distancia entre los loci del complejo HLA es pequeña (el largo total es de aproximadamente 2 cM), estos genes de los distintos loci tienden a transmitirse juntos, constituyendo un haplotipo (término que se deriva del genotipo haploide y corresponde al set completo de antígenos que se heredan juntos, debido a que los alelos correspondientes están muy cerca en un mismo cromosoma). Así, cada individuo posee dos haplotipos, uno de origen materno y otro de origen paterno.¹

Los antígenos mejor estudiados en la población general, son el sistema HLA-A y HLA-B, característicos para grupos en equilibrio, pero difieren en grupos étnicos distintos. La frecuencia esperada de un haplotipo en una población en equilibrio se obtiene del producto de las frecuencias individuales. Por ejemplo, la frecuencia del haplotipo A2, B5 en la población blanca es de 23.9 en 1 000 ($A1 = .26 \times B8 = 0.92$). Cuando la frecuencia se encuentra alterada en forma significativa, se dice que está en desequilibrio de ligamiento.¹

4. PROTEÍNAS INTRAERITROCITARIAS

HEMOGLOBINAS (HB)

El método más utilizado para investigar las variantes de hemoglobinas es la electroforesis y sus diferentes modalidades; se basa en la diferente movilidad que presentan las proteínas según su carga eléctrica, peso molecular y estructura espacial cuando se someten a la acción de un campo eléctrico. Tales características dependen del tipo, secuencia y número de aminoácidos constituyentes de las proteínas; cualquier cambio en la estructura primaria repercute, por lo general, en su comportamiento electroforético y con alguna frecuencia, en el fisiológico.^{1,2}

Desde el punto de vista antropológico, las hemoglobinas anormales son importantes por su distribución geográfica y étnica bien definidas. La hemoglobina S (HbS) es típica del noreste y centro de África, y también en los lugares donde ha habido inmigración de individuos procedentes de esas regiones. La HbC es característica de África occidental, mientras la HbE es casi exclusiva del sudeste de Asia. La HbD^{Punjab} se encuentra en alrededor de 2% de los sikhs del Punjab de la India, y en el resto de las poblaciones se encuentra en proporción menor a 1%. La β talasemia es frecuente en la cuenca del Mediterráneo, en especial en Grecia, Turquía e Italia, y la α talasemia se observa en China y algunas regiones de África y Grecia.

Glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa (G6PD)

La glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa (G6PD) es la enzima que cataliza la conversión de la glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconato durante la utilización de glucosa en el eritrocito; es la única vía de obtención de NADPH, que a su vez es necesario para mantener la concentración de glutatión reducido (GSH), sustancia indispensable para la integridad de la membrana del glóbulo rojo en presencia de sustancias oxidantes. El protómero de la G6PD tiene un peso molecular de 58 000 Da; se encuentra codificado por el cromosoma Xq28 y tiene el número 1.1.1.49, según la Comisión Internacional de Enzimas.

De las múltiples variantes de G6PD, tres de ellas son muy frecuentes a escala mundial, y sirven como marcadores antropológicos. La más común de las tres se denomina B, a la cual se le agrega un signo + cuando es normal y – cuando es deficiente. La variante B-, llamada también mediterránea por ser frecuente en esa región, tiene una actividad de 1 a 2 % de lo normal.¹

4. MARCADORES GENÉTICOS EXTRAERITROCÍTICOS

Haptoglobinas (HP)

Las haptoglobinas son globulinas α -2 que tienen la función de unirse a proteasas, en especial a la hemoglobina libre. El polimorfismo de Hp fue

descubierto por Smithies mediante la técnica de electroforesis en gel de almidón. Los fenotipos más comunes son: Hp 1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2, analizados en diferentes poblaciones. El gen de la Hp se encuentra en el cromosoma 16q22. 1. En un principio se creyó que había dos *loci*, α y β , pero se demostró que sólo hay uno y se postuló que existe una Hp precursora simple, que es procesada proteolíticamente después de la traducción para formar las subunidades α y β .^{1,2}

Se han informado algunas variantes electroforéticas con tipos de subunidades; las más importantes son de tipo α , que se dividen en clase 1 y clase 2. Las clase 1 se subdividen en 1S (lenta) y 1F (rápida), la diferencia entre ellas es el aminoácido lisina de la posición 54 en la primera y glutámico en la segunda. Las cadenas α -2 presentan aproximadamente el doble de largo de las α 1, y se cree que se ocasionan por el entrecruzamiento desigual en personas heterocigotos para α 1 (1F-1S). También se han observado variantes cuantitativas como la 2M, presente en 10% de la población negra.

Componentes de grupo específico (Gc)

Gc es una α -2 globulina sérica, constituida por una molécula de 52 000 Da de peso molecular, que tiene como función principal transportar la vitamina D y sus metabolitos. También se conoce como α -globulina-unidora de vitamina D (VDBG). Gc es miembro de la familia de la albúmina y α -fetoproteína porque comparten una alta homología en su secuencia de aminoácidos y tienen el mismo patrón de puentes disulfuro. Están codificadas por el cromosoma 4q13-q21.1.¹

Hirschfeld (1959) descubrió los fenotipos Gc1-1, Gc2-2 y Gc2-3 usando el método de inmunolectroforesis, y por segregación familiar se encontró que están determinados por los alelos GC1 y GC2. Estos fenotipos pueden observarse por diferentes métodos; el más importante es el de isoelectroenfoque (IEF) porque permite separar proteínas con diferencia de 0.1 unidades de pH. De esta manera, Constans y Viau (1977) descubrieron que el Gc1 se subdivide en Gc1S (lento) y

Gc1F (rápido). La diferencia entre ambos subtipos de GcI se encuentra en la adición de un residuo de ácido siálico postraducciona l a la molécula de Gc para dar la variante 1F. Por el contrario, Gc1 se diferencia de Gc2 por su estructura básica. Usando el método de IEF, varios grupos de investigadores han informado los resultados de este marcador en varias poblaciones, de las que Kamboh y Ferrel (1986) resumen los resultados de 160 grupos diferentes.¹

En la actualidad se han identificado cerca de 90 variantes de Gc, y algunas son frecuentes en poblaciones aisladas.

TRANSFERRINA (Tf)

La transferrina, descubierta por Schade y Caroline (1946), es una glucoproteína sérica de 76 500 Da. de los que 75 157 corresponden a la cadena de 679 aminoácidos y el resto a un grupo carbohidrato. Su función principal es transportar hierro del intestino, sistema reticuloendotelial y células del parénquima hepático a todas las células proliferativas en el organismo, por un mecanismo de endocitosis mediado receptor.^{1, 5}

La descripción del polimorfismo de esta proteína la realizó Smithies (1958), quien utilizó la electroforesis en gel de almidón; las bandas que observó las denominó TfC, TfB y TfD, de acuerdo con la frecuencia en la población con una movilidad electroforética intermedia, rápida y lenta, respectivamente. Después, las variantes B y D se subdividieron en B0, B1 y B2, y D0, D1, D2 y D3, siendo B0 la más rápida y D3 la más lenta de todas. Más tarde se describieron otros alelos.¹

ALBÚMINA (Aib)

La albúmina es la proteína sérica más abundante, sintetizada en el hígado como preproalbúmina y transformada en proalbúmina en el retículo endoplásmico rugoso y en albúmina en las vesículas de Golgi, de donde se excreta a la circulación; tiene como función transportar diferentes compuestos endógenos e

intervenir en la regulación coloidosmótica de la sangre; está codificada por el cromosoma 4q11-q13 y pertenece a la familia de la α -fetoproteína y Gc. En la actualidad se han descrito 23 variantes analizadas con diferentes amortiguadores, por lo que se consideran "bien establecidas". Estas variantes recibieron los nombres de bisalbúminas, paralbúminas y aloalbúminas; se heredan en forma autosómica codominante y casi todas se han encontrado en heterocigota, mostrando una banda normal (A) y otra que migra más rápido o más lento que la normal.¹

A pesar del gran número de variantes, sólo tres alcanzan una proporción mayor de 1 % en la población en general; éstas son:

1. La Naskapi, que tiene un cambio de lisina por glutámico en la posición 372 de la molécula normal, 2. La variante México-2, que presenta un cambio de glicina a aspártico en la posición 550, y tiene una frecuencia de 1.24% en indígenas mexicanos y de 1.64% en mestizos mexicanos; 3. La variante Yanomama-2 parece representar un polimorfismo privado verdadero, ya que se ha encontrado únicamente en indígenas yanomama de Sudamérica, con una frecuencia promedio de 14% en 21 poblaciones estudiadas.¹

6. POLIMORFISMOS DE DNA

El ácido desoxirribonucleico (DNA) de los eucariontes contiene, además de las secuencias nucleotídicas que codifican para proteínas, otras regiones que pueden o no estar involucradas en el control de la transcripción de los genes.^{8, 10, 12}

Estas secuencias no codificantes (incluyendo a los intrones) pueden alterarse por mutaciones puntuales sin repercusión aparente, dando lugar a polimorfismos que pueden llegar a ser marcadores genéticos importantes para el ligamiento o ubicación de genes, y para el estudio de las poblaciones.¹²

Una de las primeras metodologías empleadas para el estudio de estas regiones polimórficas se basa en el empleo de enzimas de restricción obtenidas de bacterias principalmente, que reconocen secuencias nucleotídicas específicas y cortan el DNA en sitios determinados. Los fragmentos obtenidos pueden presentar una longitud variable en individuos diferentes, y se conocen como RFLP (restriction fragment length polymorphism). La variación en el tamaño de los fragmentos puede deberse a mutaciones (cambios, adiciones o deleciones nucleotídicas) cercanas a los sitios de reconocimiento de las endonucleasas. Los fragmentos son resueltos por electroforesis en geles de agarosa, transferidos a membranas de *nylon* o nitrocelulosa y revelados con sondas marcadas, específicas para la región en cuestión y posteriormente reveladas. Este proceso se conoce como método de Southern. Las RFLP pueden ser "silenciosas", esto es, no producen alteración bioquímica o fisiológica en el organismo, o pueden estar ligadas a un gen portador de una patología. Las que se relacionan con un padecimiento pueden seguirse por su segregación a través de generaciones si los portadores son heterocigotos para ese marcador, esto es, que lleven un alelo normal y otro ligado al padecimiento.^{5, 13}

Por otra parte, desde hace mucho tiempo atrás el establecimiento de la identidad individual y la paternidad biológica constituyó un serio problema en el ámbito científico – legal, debido como ya se explicó, a que los marcadores genéticos que se utilizaban en el laboratorio no determinaban de forma concluyente los caracteres que cada individuo heredaba de sus progenitores.

El descubrimiento de marcadores de DNA en regiones polimórficas, como las regiones descubiertas por Alec Jeffreys y denominadas minisatélites, permitió obtener por primera vez una información muy precisa acerca de la identidad genética de un individuo, gracias a su alto grado de discriminación. El descubrimiento a principios de los años noventa de un gran número de regiones microsatélites o repeticiones cortas en serie (STRs por sus siglas en inglés: short tandem repeats) en el genoma humano permitió superar las limitaciones de los

anteriores sistemas clásicos como los RFLP y los VNTR; debido a que el tamaño de sus alelos es generalmente más pequeños que los anteriores y por tanto, son susceptibles a ser analizados por técnicas de amplificación como la PCR que ofrecen gran sensibilidad. Las innumerables ventajas de los STRs han hecho que su tipificación se convierta en uno de los métodos de elección en biología de la paternidad.^{13, 19}

En algunos casos cuando no se encuentran disponibles para el estudio los parientes directos (padre y madre) se puede recurrir a muestras de otros parientes como: tío(a), abuelo(a), etc. En estos casos es necesario complementar los estudios con otros marcadores genéticos de matri o patrilinea que permiten rastrear la información heredada por vía materna o paterna.

En el presente trabajo dirigido pretendemos proveer las herramientas necesarias para un entrenamiento y aplicación en un laboratorio de genética forense. En el se describen una serie de técnicas, resultado de la experiencia y estandarización en la formación académica de la especialidad.^{13, 19}

7. LA HUELLA GENÉTICA O PERFIL DEL DNA.

El conocimiento más detallado de las regiones del DNA ha permitido utilizarlo para diferenciar a un individuo o determinar sus relaciones biológicas de parentesco. Alec Jeffreys fue el primero en realizar estos estudios, obteniendo un patrón de bandas parecido a un código de barras que denominó **huella digital del DNA** o **huella genética**. Los marcadores moleculares de elección para estas pruebas son las regiones con repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y las repeticiones cortas en tándem (STR), los cuales poseen unidades de repetición de 30 pb en promedio, y de 2 a 5 pb, respectivamente (Carracedo, 1995).^{20, 22}

Al utilizar cualquier marcador molecular en pruebas de identidad es importante considerar que el ser humano es un organismo diploide, es decir, que su material

genético está en doble dosis, una heredada del padre y la otra de la madre. Por ejemplo, para un STR del cromosoma 1 con una estructura AGT AGT AGT AGT con n repeticiones, cada persona se identificará de acuerdo con el número de repeticiones que tenga el STR de sus dos cromosomas 1, es decir, por sus dos alelos, de manera que al observar a un individuo con un genotipo 6/4 para ese STR, se puede inferir que forzosamente sus padres tendrán alguno de estos alelos (figura 3.3). Al ir analizando varios marcadores en un individuo, se va creando un código conocido también como **perfil de DNA**.^{1,2}

En la huella digital del DNA desarrollada por Jeffreys se analizaban mediante Southern blot varios VNTR al mismo tiempo, resultando una herramienta muy poderosa para pruebas de identidad. Sin embargo, ciertos problemas de interpretación, análisis estático y reproducibilidad, han ocasionado que sean más frecuentes las pruebas donde se analice un VNTR a la vez, lo cual facilita los cálculos al conocer la frecuencia de sus alelos en la población. Por otra parte, utilizar la técnica de Southern con este fin representa ciertas limitaciones, ya que requiere suficiente cantidad de DNA de alto peso molecular, emplea sondas marcadas con diferentes métodos para obtener alta sensibilidad en la detección, es laboriosa y existe cierta imprecisión para resolver los alelos (Pena y Chakraborty, 1994).

A la fecha, una de las técnicas más utilizadas para obtener perfiles de DNA es la reacción en cadena de polimerasa (PCR), ya que permite generar millones de copias o amplificar los VNTR y STR a partir de cantidades mínimas de muestra (figura 3.4). Posteriormente, el par de alelos de un individuo puede observarse con facilidad mediante diferencias en la migración al someter los productos amplificados a electroforesis, razón por la cual la técnica también se conoce como polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (Amp-FLP). Figura 3.5. Los STR tienen una ventaja adicional debido a su tamaño pequeño, ya que varios se pueden amplificar en una sola reacción, conocida como PCR múltiplex y analizarse en una sola electroforesis. Las ventajas que ofrece la PCR para identificar individuos con

respecto a la técnica de Southern son: gran sensibilidad, sencillez y versatilidad, ya que permite trabajar muestras de DNA parcialmente degradadas o impuras que pueden extraerse de diversas fuentes, como cabello, saliva, hueso, semen, etc., lo cual es común en el área de trabajo forense.^{1, 2, 14}

8. Criterios para la selección de marcadores genéticos.

En estudios de paternidad o de identificación genética deben elegirse fenotipos que cumplan con los siguientes requisitos:

- Deben seguir un patrón de herencia conocido con certeza.
- Deben tener expresión completa desde el nacimiento y esta expresión debe permanecer inalterable durante toda la vida, sin sufrir cambios por efectos ambientales.
- Deben tener variabilidad, dentro de la población.

Existen algunos rasgos físicos fácilmente detectables, que podrían ser utilizados en peritajes de identificación genética; sin embargo, en términos generales, su utilidad es baja, ya que su variabilidad poblacional es muy restringida y, además, son fenotipos que pueden ser modificados por el ambiente. Este es el caso de rasgos como la polidactilia u otras malformaciones congénitas de origen monogénico.²

Fenotipos que cumplen con los requisitos mencionados son los marcadores genéticos, los cuales pueden ser clasificados del siguiente modo:

- Grupos sanguíneos.
- Antígenos del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (HLA).
- Proteínas plasmáticas o eritrocitarias.
- Polimorfismos del DNA.

Como ya se mencionó los grupos sanguíneos constituyen fenotipos que están determinados por la presencia de antígenos de superficie de los glóbulos rojos, controlados por un número variable, de genes alélicos. Los antígenos del Sistema HLA, son antígenos de superficie que están presentes en las células

nucleadas del organismo y están controlados por varios genes ligados, cada uno de los cuales presenta numerosas alternativas alélicas, por lo que resulta ser un marcador muy informativo.²

Las proteínas plasmáticas o eritrocitarias son, en general, enzimas que resultan informativas cuando existen variantes polimórficas, para ellas, en la población. Su variabilidad es distinguible mediante técnicas de electroforesis de proteínas y están controladas por un número reducido de alelos, cuya herencia sigue un patrón mendeliano.^{1,2}

Los polimorfismos del ADN corresponden a fenotipos resultantes del análisis directo de la molécula de ADN, en aquellas regiones en que ésta es extremadamente variable entre los distintos individuos. Estos fenotipos resultan tremendamente informativos en problemas de identificación genética, ya que son altamente específicos para cada persona.^{1,2}

El estudio detallado de la mayoría de estos marcadores genéticos en problemas de paternidad o de identificación genética será analizado en distintos capítulos a lo largo del presente trabajo. Sin embargo, antes de hacerlo es necesario aclarar cuáles son los criterios con los que se selecciona un marcador genético como buen indicador de individualidad genética. Ejemplificaremos estos criterios refiriéndonos a problemas de paternidad dudosa, pero se pueden utilizar razonamientos análogos en otros problemas de identificación genética.

En consultas por paternidad dudosa, la situación más concluyente y la única aceptada legalmente en algunos países, es la exclusión del individuo que ha sido erróneamente acusado como padre de un niño. Existen dos tipos de exclusión de paternidad:

Tipo 1: un hombre es excluido como posible padre si él y la madre carecen de un gen que está presente en el niño.

Tipo 2: un hombre es excluido como posible padre si genes que él debiera haber transmitido a su hijo, no aparecen en el niño; por ejemplo un hombre de grupo AB no puede tener un hijo de grupo O (en referencia al grupo sanguíneo ABO).

La eficiencia de un marcador genético en problemas de paternidad, se mide a través de un parámetro llamado "Probabilidad de Exclusión", la cual se define como la probabilidad de que un hombre falsamente acusado de ser padre de un hijo, sea excluido de dicha presunción con el análisis del marcador genético particular que se considera.²³

La Probabilidad de Exclusión depende del número de alelos existentes en la población para ese locus génico, de las relaciones de dominancia existente entre los alelos y sus respectivas frecuencias génicas. El ejemplo más simple de exclusión de paternidad sería el considerar un locus génico con dos alelos, uno de ellos dominante. Llamemos A al alelo dominante y a al recesivo y llamemos p y q a sus respectivas frecuencias relativas en la población. En un locus génico como éste, la única situación en que un hombre puede ser excluido como padre es aquella en que su genotipo es aa, la madre es aa y el hijo es Aa. La Probabilidad de Exclusión, PE, en este caso es por lo tanto:

$$PE = P_m \times P_{ma} \times P_p$$

Donde:

P_m = probabilidad de que la madre tenga genotipo aa.

P_{ma} = probabilidad de que una madre con genotipo aa, tenga un hijo Aa.

P_p = probabilidad de que el padre presunto tenga genotipo aa.^{1, 2, 23}

CAPÍTULO IV.- ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES DE APLICACIÓN EN GENÉTICA FORENSE.

1. TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

1) Técnica de extracción FTA (Gibco BR):

1. Con una lanceta pinchar el dedo pulgar del individuo después de haberse limpiado con alcohol.
2. Dejar caer las gotas en una tira de papel FTA.
3. Dejar secar una hora a medio ambiente.
4. De la mancha de papel se cortan pequeños trocitos entre 1 y 2 mm de diámetro con una hoja de bisturí o sacabocado.
5. Los trocitos de papel se colocan en un eppendorf de 1.5 ml y se le adicionan 250 µl de buffer de extracción FTA, se mezcla suavemente con vortex y se coloca en un agitador mecánico por 5 minutos.
6. Se prosigue con un toque de centrifuga y se extrae todo el contenido líquido del tubo con una pipeta ó por decantación.
7. Posteriormente se realizan dos lavados, se hacen con 250 µl de agua FTA, destilada y deionizada (agua ultra pura), se le extrae todo el líquido y finalmente se separan los trocitos de papel con la ayuda de una puntilla en las paredes del tubo y se dejan secar a temperatura ambiente toda la noche ó a 37 °C en estufa por 30 minutos.

Papel FTA.- La tecnología del papel FTA, es utilizada para coleccionar, transportar y archivar todos los ácidos nucleicos a la temperatura del ambiente. Las tarjetas FTA, tecnología patentada por Whatman FTA, simplifica el manejo y el procesamiento de los ácidos nucleicos.

Las tarjetas FTA contienen los químicos para lisar células, desnaturalizar proteínas, y proteger a los ácidos nucleicos de nucleasas, oxidación y daño por rayos UV. Las tarjetas FTA vuelven inactivos rápidamente a los

microorganismos, incluyendo los patógenos que lleva la sangre y previene el crecimiento de bacterias y otros. El principio de captura del DNA en el papel FTA es el siguiente. Las tarjetas FTA están impregnadas con una fórmula química patentada que lisa las membranas celulares y desnaturaliza las proteínas. De esta forma los ácidos nucleicos son atrapados físicamente siendo inmovilizados y estabilizados. Una vez inmóvil, el ácido nucleico queda protegido, de nucleasas, oxidación, daño bacteriano y hongos, pudiendo ser almacenado a temperatura ambiente por años. El papel FTA es en conclusión un conjunto de reactivos liofilizados y patentados cuyo objetivo es extraer el material genético requerido de una manera fácil y que permita de igual manera una conservación de la muestra que no necesite de muchos cuidados.

2) Extracción de DNA en mezclas de secreción vaginal, sangre o semen.

Procedimiento de análisis:

1. Cortar una porción del hisopo y colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar al vial con la secreción vaginal:

TNE ----- 400 UI
Sarcosil 20% ----- 25 µl
H2O destilada esteril ----- 70 µl
Proteinasa K (20 mg/ml) ----- 5 µl

*TNE (Tris-EDTA-NaCl: 10 – 10 – 100 mM respectivamente)

3. Mezclar y colocar el tubo a 37 °C x 2 horas.
4. Centrifugar a 14000 rpm. Tomar el sobrenadante con sumo cuidado y colocarlo en otro tubo de 1.5 ml (**Fracción femenina del análisis**). Conservar el precipitado (pellet) que corresponde a la (**Fracción masculina del análisis**).
5. A la fracción femenina agregar igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 Agite en vortex por 30 segundos. Realizar 2 lavados con la misma preparación.

6. Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm.
7. Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo. NO ALTERAR LA INTERFASE. Descarte el tubo anterior.
8. Agregue 10 μL de NaCl 5M y mezclar.
9. Agregue 1 ml de etanol 100% frío. Mezclar por inmersión y colocar el tubo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.
10. Centrifugar por 10 minutos y decantar el etanol.
11. Lavar el botón con 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y centrifugar por 5 minutos.
12. Decantar cuidadosamente el etanol o removerlo cuidadosamente.
13. Secar el pellet.
14. Resuspender el DNA en 50 μL de TE 1X a 56°C entre dos hora o por toda una noche.
15. Congelar para preservar las muestras.²³

PARA LA FRACCIÓN MASCULINA O SEMEN.

16 Agregar al tubo:

TNE -----	150 UI
Sarcosil 20 % -----	50 μL
DTT 0.39 M -----	40 μL
H ₂ O destilada esteril -----	150 μL
Proteinasa K (20 mg/ml) ----	10 μL

- 17 Mezclar e incubar por 2 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 18 Agregar igual volumen de fenol: cloroformo y otra de cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Aplicar vortex por 30 segundos y centrifugar.
- 19 Repetir 2 veces mas, una con fenol: cloroformo y otra con cloroformo.
- 20 Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y descartar el anterior.
- 21 Referirse al punto 7 del protocolo de extracción de secreción vaginal.

3. Extracción de DNA a partir de muestras de sangre. Método RED – EXTRACT Amp Blood kits.

1. Colectar una muestra de sangre con 1 gota de EDTA 7% con una lanceta del dedo pulgar.
2. Colocar 20 μ L de la “Solución de lisis de sangre” en un Eppendorf de 1.5 ml.
3. Añadir 10 μ L de sangre y agitar.
4. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Agregar 180 μ L de la “Solución de neutralización para sangre” y vortexear.
6. Guardar a 4°C proceder de inmediato con la técnica del PCR.

Realizar el protocolo de amplificación PCR – KIT – RED Extract N – Amp Blood PCR kits.

4) Extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica.

a. Reactivos:

1. Solución A: Sacarosa 0,32 M; Tris 10mM, pH 7,5; MgCl₂ 5mM; Tritón X-100, 1% (v/v). Mantener a 4 °C.
2. Solución B: Tris 10mM, pH 7,5; NaCl 0,4M; EDTA 2mM, pH 8,0. Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente.
3. Solución C: Ácido cítrico, 0,48 g.; Citrato de sodio 1,32 g; Glucosa 1.47 g. Esterilizar por filtración y mantener a 4 °C.
4. Solución TE: Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0. Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente.

b. Materiales:

Tubos plásticos de 50 ml; Tubos plásticos de 15 ml; Tubos de 2 ml para microcentrífuga; Centrífugas clínica y microcentrífuga.

c. Procedimientos:

Este método es una modificación del método originalmente descrito por Miller y cols.

1. Obtener 10 mL de sangre en un tubo que contiene 1,75 mL de ACD como anticoagulante. ACD (solución salina bipotásica EDTA 7% p/v).
2. Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 2.500 rpm a temperatura ambiente.
3. Aspirar el plasma sobrenadante hasta unos 5 mm antes del precipitado.
4. Agregar solución A hasta un volumen final de 25 mL, mezclando por inversión y dejar en hielo durante 30 minutos.
5. Centrifugar como en el segundo paso, aspirando aproximadamente 21 mL de sobrenadante. Existe un precipitado difícil de ver por lo transparente.
6. Agregar nuevamente solución A hasta completar los 25 mL y colocar en hielo durante 20 min.
7. Centrifugar como en el segundo paso y aspirar cuidando de no perder el pellet del fondo del tubo. Eliminar cuidadosamente el máximo de líquido con papel absorbente.
8. Resuspender el pellet en 1,5 mL de solución B. Transferir el contenido a un tubo cónico de 15 mL. Agregar 0,05 mL de SDS al 20% y 0,25 mL de una solución de proteinasa K (2 mg/mL de proteinasa K en SDS al 1%) e incubar a 37 °C durante toda la noche agitando ocasionalmente durante la primera hora.
9. Agregar 0,5 mL de NaCl saturado (aproximadamente 6 M) y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Centrifugar como en las etapas precedentes.
10. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo cónico de 15 mL, evitando remover las proteínas precipitadas al fondo.
11. Agregar al sobrenadante 2 volúmenes de etanol al 95%, invirtiendo varias veces el tubo para lograr la precipitación del DNA.
12. Centrifugar durante 5 min. a 2.500 rpm y eliminar el sobrenadante. Lavar el DNA con una solución de etanol al 70%. Centrifugar nuevamente, retirar el sobrenadante y secar el DNA exponiendo el tubo al aire durante 10 min.
13. Disolver el DNA seco agregando 0,5 mL de TE. Someter el tubo a agitación

suave en un baño a 37 °C durante 1 a 2 horas.

14. Cuantificar el DNA tomando 5 microlitros de solución y diluyendo con agua a 1 mL para leer la densidad óptica de esta solución a 260 nanómetros (una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 50 microgramos por mL).
15. Diluir la solución de DNA agregando TE hasta lograr una concentración de 0,3 mg/mL. Asegurándose de mezclar muy bien esta solución viscosa, tras la adición del TE.

5) Extracción de DNA a partir de sangre, método Gen Elute, de Sigma:

1. Colocar 200 µl de sangre periférica dentro de un eppendorf. Añadir 20 µl de Proteinasa K.
2. Agregar 200 µl de solución de lisis C. Dar vortex fuerte por 15 seg. Se debe crear una mezcla homogénea para lograr una lisis eficiente.
3. Incubar a 55 °C por 10 min.
4. Preparar la columna añadiendo 500 µl de la solución a cada columna preensamblada GenElute. Centrifugar a 12.000xg por un min. Descartar el líquido.
5. Añadir al tubo preparado del paso 3, 200 µl de etanol 95-100 %. Mezclar por 5-10 seg.
6. Transferir el contenido completo de la solución alcohólica a la columna previamente preparada del paso 4. Usar para esto una pipeta cortada en su punta, para evitar aerosoles dentro de la columna.
7. Centrifugar a 6500 x g por 1 min.
8. Descartar el tubo de colección y colocar la columna en un nuevo tubo de colección.
9. Añadir 500 µl solución de lavado (previamente diluida como se indica más adelante) a la columna.
10. Centrifugar a 6500 x g por 1 min.
11. Descartar el tubo de colección y colocar un nuevo tubo.

12. Realizar un segundo lavado con 500 µl de la solución. Centrifugar a la máxima velocidad por 3 min hasta secar la columna.
13. Centrifugar por un min adicional para garantizar la totalidad eliminación del etanol.
14. Descartar el tubo de colección y colocar un nuevo tubo.
15. Agregar en el centro de la columna 200 µl de solución de elusión. Incubar a temperatura ambiente por 5 min. Centrifugar a 6500 x g por un min.
16. El tubo de colección contiene ahora DNA de alta pureza. Almacenar entre 2-8 °C. Para análisis a largo tiempo, conservar a – 20 °C.

Solución de lavado:

Diluir la solución con 10 ml (10 tubos), 80 ml (70 tubos), 360 ml (350 tubos) de etanol 95-100 %. Después de uso, tapar herméticamente para evitar la evaporación del fenol.

6) Extracción de DNA de apéndices pilosos.

1. Utilizando un escalpelo limpio, trocee el apéndice piloso y si tiene bulbo, tomar unos 5 mm.
2. Añadir la porción de raíz a 200 µl de Chelex al 5% contenidos en un tubo de centrifuga de 1.5 ml con rosca.
3. Incubar a 56 °C no menos de 8 horas.
4. Aplique vortex a alta velocidad por 5-10 segundos.
5. Colocar en agua hirviendo durante 8 minutos.
6. Aplique vortex a alta velocidad por 5-10 segundos.
7. Centrifugar 2 a 3 minutos a 10000-15000 rpm.
8. Añadir 40 µl de sobrenadante a la mezcla de PCR, si el pelo no tenía bulbo, de lo contrario agregar unos 10 µl.

7) EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MANCHAS (DLB):

(Manchas Sanguíneas sobre soportes sólidos absorbentes ó no: papel, textiles varios, vidrio, gasa, etiquetas o cinturones de cuero, madera, etc.). Las manchas

sobre soportes no absorbentes se tomarán con hisopo humedecido en agua ultrapura (destilada, deionizada y estéril).

1. Humedecer un hisopo y recoger material biológico de la mancha de cualquier superficie. Dejar secar. (Sólo para manchas sobre superficies no absorbentes)
2. Cortar 1 o 2 cm del soporte en pedacitos de unos 2 mm y resuspenderlos en 500 μ l de tampón DLB (ver preparación de soluciones y reactivos).
3. Añadir 50 μ l de SDS al 10% y 10 μ l de Proteinasa K (10mgr/ml).
4. Incubar a 50 °C toda la noche con agitación suave.
5. Añadir 20 μ l de NaCl 5M y 575 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Fenol 287 μ l: Cloroformo: 287 μ l. Mezcle por inversión.
6. Centrifugar 10 min a 12000 rpm, pasar la fase acuosa (la superior) a otro tubo con una punta amarilla cortada.
7. Añadir 575 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (para extraer el fenol). Centrifugar por 3 min a 12000 rpm.
8. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 ml de etanol frío (-20 °C). Guardar 15 min a -80 °C y centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos.
9. Secar el precipitado al aire y resuspender en 100 μ l de buffer TE 1X a 56 °C entre 2 horas y toda la noche.
10. Colocar 1 μ l en minigel de agarosa 1%. Deberían obtenerse unos 50 ng/ μ l. El rendimiento final es de unos 2-5 μ g/cm².

*TE 100X (contiene EDTA 100 mM y Tris-HCl 1M)

8) Extracción de DNA en manchas de fluídos biológicos diversos.

1. Recortar una porción de la mancha de unos 5x5 mm.
2. Incubar en 400 μ l de Buffer TNE, (Tris-EDTA-NaCl: 10-10-100mM respectivamente) y 7.5 μ l de Proteinasa K al 20% a 56 °C durante toda la noche.
3. Retirar el papel con la ayuda de un tip, exprimiéndolo bien.
4. Extraer sucesivamente con 300 μ l de fenol y 300 μ l cloroformo-isoamílico (24:1).

5. Repetir el procedimiento con un volumen de cloroformo-isoamílico (Sevag).
6. Finalizar el proceso colocando el ADN (fase superior) en un Microcon 100 (según instrucciones del fabricante). Efectuar dos ó tres lavados con 300 μ l de agua destilada cada uno y resuspender en 50 μ l con agua ultrapura. De no tener microcon, precipitar con etanol y suspender pastilla en 30 μ l de buffer TE1 X.
7. Congelar para preservar las muestras.

9) Extracción de DNA a partir de restos óseos:

1. Se toma un mortero de porcelana y se colocan las muestras de hueso, aprox. 2 gramos de hueso, se le vierte el nitrógeno líquido y se deja aprox. 30".
2. Se machaca con el mortero.
3. Se puede repetir el paso anterior hasta completar mas o menos 2 grs de polvo de hueso bien fino. (Dependiendo del tamaño del hueso se consumen entre 400 y 500 ml de nitrógeno líquido).
4. En tubos de 15 ml se coloca el polvo del hueso, si el sedimento agregado marca entre 2 y 3 ml se aplican 4 ml del buffer de lisis.
5. Se tapa con parafilm, se da vortex (de 30 a 60") y se incuba a 56 °C en Baño de maria agitando de vez en cuando.
6. Se deja de 16 a 18 horas incubando, pero es importante mezclar de vez en cuando.
7. Al otro día, luego de las 18 horas, se centrifuga la muestra por 10' a 2500 rpm (No debe ser muy fuerte, es decir mayor de 3000 las rpm), el sobrenadante se toma y se pasa a otro tubo, se lleva a ebullición a 100°C por 10' para inactivar la proteinasa k.
8. Si hay 3 ml de sobrenadante se le agregan de 0,5 a 1 ml de NaCl 3M, hasta obtener la precipitación de las proteínas, luego se centrifuga de 5 a 8 minutos y el sobrenadante se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto ó se purifica con etanol absoluto ó tubos microcon.

10) Extracción con fenol-cloroformo

Material y Reactivos:

Materiales:

1. Tubos eppendorf 1.8 ml.
2. Tips azules y amarillos.
3. Micropipetas.
4. Microcentrífuga.
5. Vortex.
6. Cubeta con hielo.
7. Guantes de látex.
8. Papel filtro.
9. Jeringa desechable.
10. Algodón y alcohol.
11. Termociclador o baños a 98°C y 65°C.
12. Hisopos *Catch-All™ Sample Collection Swabs*.

Reactivos:

1. EDTA disódico.
2. SDS 20%.
3. Proteinasa K 2 mg/ml.
4. NaCl 6 M.
5. Etanol absoluto.
6. Agua destilada estéril

Solución A:

Sucrosa 0.32 M
Tris pH 10mM
MgCl₂ 5 mM
Tritón 100XI%(v/v)

Solución B:

Tris pH 7.5 10mM

NaCl 400mM

EDTA 2 mM

Solución Quick Extract

Procedimiento:

1. Recolectar 500 μ l de sangre en un tubo eppendorf de 1.8 ml.
2. Añadir 750 μ l. de "Solución A". Mezclar por inversión suavemente.
3. Reposar en hielo durante 30 minutos.
4. Centrifugar a 2500 rpm por 3 min. Desechar el sobrenadante aproximadamente 100 a 200 μ l en el tubo.
5. Añadir 750 μ l de solución A. Mezclar por inversión suavemente.
6. Dejar en hielo durante 20 min.
7. Centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos y desechar el sobrenadante por inversión. Escurrir el exceso de sobrenadante del tubo con una servilleta también por inversión.
8. Suspender el pellet en 75 μ l. de solución B, 2.5 μ l de SDS 20%, 12.5 μ l de proteinasa K 2 mg/ μ l. Dejar en reposo a 37°C por 18 horas (toda la noche).
9. Añadir 25 μ l de NaCl 6M. Mezclar en vortex durante 3 minutos y centrifugar a 2500 rpm por 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
11. Agregar un V: V de fenol-cloroformo y mezclar por inversión suavemente.
12. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
13. Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf nuevo.
14. Realizar dos lavados adicionales con fenol-cloroformo.
15. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto.
16. Dejar precipitando el DNA a -20°C por 2 horas.

17. Centrifugar a 14000 rpm durante 20 minutos y desechar todo el sobrenadante con cuidado de no tocar las paredes del tubo.
18. Secar el DNA a 37 °C.
19. Resuspender el DNA en agua tridestilada.
20. Sembrar en gel de agarosa al 1 %.

**11) Extracción de DNA a partir de células de mucosa bucal.
*BuccalAmp™ DNA Extraction Kit QuickExtract™ DNA Extracción
Solution 1.0 Catch-All™ Sample Collection Swabs.***

1. Etiquete los tubos que contienen la solución de extracción QuickExtract DNA 1.0 (250 µl).
2. Aclare la boca del cliente dos veces con agua. Se recomienda que las personas se abstengan de tomar café antes del muestreo. Alternativamente pida a los pacientes que se cepillen gentilmente el interior de las mejillas sin pasta dental y prosiga con un segundo enjuague con agua.
3. Obtenga la muestra con el hisopo raspando firmemente el interior de las mejillas, aproximadamente 20 veces cada lado, asegurándose que se colecten células de toda la superficie de su interior. Si se almacenan o transportan las muestras, deje secar el hisopo por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Guarde el hisopo seco en el contenedor original a 22°C o 37 °C hasta un lapso de una semana previa a la extracción del DNA. Para un mayor tiempo de almacenamiento, se debe mantener el hisopo a -20°C hasta por 6 meses. El rendimiento es proporcional a la cantidad inicial de células bucales. Si el rendimiento no es su preocupación, utilizar solo un hisopo para ambas mejillas. Si el rendimiento es importante utilizar un hisopo por cada mejilla.
4. Coloque el hisopo en el tubo que contiene la solución de extracción (250 µl) y rote la cabeza al menos 5 veces apretando contra los lados del tubo, asegurándose que la mayor parte del líquido quede en el tubo.

5. Cierre el tubo y mezcle con vortex por 10 segundos. Incube el tubo a 65°C por 30 minutos.
6. Vortexear la mezcla por 15 segundos.
7. Transferir el tubo a 98°C e incubar por 8 minutos.
8. Vortexear la mezcla por 15 segundos.
9. Transferir el tubo a 98°C e incubar por 8 minutos.
10. Vortexear la mezcla por 15 segundos.
11. Almacenar el DNA a -20°C, o a -70°C por largos periodos de almacenamiento.

El rendimiento es usualmente de 2 a 14 ng/μl.

12) Protocolo de extracción de DNA de tejidos con *EPICENTRE BuccalAmp™ DNA Extraction Kit QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 Catch-All™ Simple Collection Swabs*.

El siguiente protocolo también fue diseñado para extraer DNA de células HeLa, folículos pilosos, uñas, células bacterianas y plumas.

Este hace uso del *DNA Extraction Kit QuickExtract™ DNA Extraction Solution 1.0 Catch-All™ Sample Collection Swabs* y es útil para obtener DNA genómico destinado para amplificaciones por PCR.

1. Etiquete los tubos que contienen 0.5 ml de la solución QuickExtract.
2. Coloque una muestra en cada tubo, por ejemplo:
 - a. 10⁴ células HeLa.
 - b. 0.5 a 1 cm de pelo con folículo.
 - c. 0.5 a 1 cm de corte de cola de ratón finamente cortada con una hoja de bisturí.
 - d. Una colonia de *E. coli*.
 - e. 0.5 a 1 cm de la región final de una pluma proveniente de un ave

que fue arrancada y almacenada a 4 ° C.

3. Vortexear la mezcla por 15 segundos.
4. Transferir el tubo a 65°C e incubar por 30 minutos.
5. Vortexear la mezcla por 15 segundos.
6. Transferir el tubo a 98°C e incubar por 15 minutos.
7. Almacenar el DNA a -20°C, o a -70°C por largos períodos de tiempo.
8. Utilizar 5 µl o menos del DNA extraído para cada amplificación por PCR.

13) Extracción de DNA mediante el protocolo *Wizard DNA Purification kit*.

1. Colocar 900 µl de solución de lisis celular a un tubo eppendorf estéril.
2. Alicuotar 300 µl de sangre en EDTA o citrato en el tubo eppendorf con la solución de lisis y mezclar por inversión 5 a 6 veces.
3. Incubar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos (mezclar por inversión 2 a 3 veces por inversión una vez durante la incubación). Centrifugar entre 12000 y 13000 rpm por 20 segundos a temperatura ambiente.
4. Descartar todo el sobrenadante posible con mucho cuidado aproximadamente 10 a 20 µl de residuo quedaran en el tubo. Si la muestra de sangre ha sido congelada repetir los pasos del 1 al 4 hasta que el pellet sea blanco.

Nota.- Algunas células rojas o desechos celulares pueden ser visibles junto con las células blancas. Si el pellet parece contener solo células rojas adicione una alícuota de la solución de lisis celular después de haber removido el sobrenadante y repita los pasos 3 a 4.

5. Vortexear vigorosamente hasta que las células blancas se resuspendan (10-15 segundos).
6. Añadir 300 µl de la solución de lisis nuclear al tubo que contiene las células resuspendidas y pipetee la solución entre 5 a 6 veces. La solución

se debe volver viscosa. Si algunos cúmulos de células se hacen visibles después de la agitación, incube la solución a 37 °C hasta que los mismos desaparezcan. Si los cúmulos aún son visibles después de 1 hora de incubación, adicione 100 µl de la solución de lisis nuclear y repita la incubación.

7. Opcional: Adicione 1.5 µl de solución de Rnasa al lisado nuclear y mezcle por inversión de 2 a 5 veces. Incube la mezcla a 37°C por 15 minutos y después enfríe a temperatura ambiente.
8. Adicione 100 µl de solución de precipitación proteica al lisado nuclear y vortexee vigorosamente por 10 a 20 segundos. Pequeños cúmulos de proteínas pueden hacerse visibles después de la agitación.
9. Centrifuge de 12000 a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Un precipitado café se hará visible. Si no hay pellet, revise nuevamente el procedimiento o consulte la tabla de problemas del fabricante.
10. Transfiera el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril que contenga 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Mezcle gentilmente por inversión hasta que tiras visibles de DNA formen un cúmulo.
12. Centrifugue de 12000 a 13000 rpm por un minuto a temperatura ambiente.
13. Decante el sobrenadante y adicione un volumen de etanol al 70%. Gentilmente invierta el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA y centrifugue como en el paso 12.
14. Aspire cuidadosamente el sobrenadante sin disturbar el pellet. Invierta el tubo en papel absorbente y deje secar por 10 a 15 minutos.
15. Adicione 100 µl de solución de rehidratación e incube a 65°C por una hora. Mezcle periódicamente la solución. Alternativamente, rehidrate el DNA a 4°C por toda la noche.
16. Almacene de 2 a 8°C.

2. EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD, INTEGRIDAD Y CALIDAD DE LAS MUESTRAS AISLADAS.

1) Preparación de gel de agarosa al 2.0%

1. Prepare una solución de TBE 1X a partir del concentrado 10X para preparar el gel y llenar la cámara de electroforesis.
2. Disuelva 2.0 g de agarosa en 100 ml de solución TBE 1 X y caliente la mezcla hasta lograr la disolución total de la agarosa.
3. Una vez disuelta la agarosa, enfríe hasta aproximadamente 55°C antes de vaciar en el molde formador del gel. El grosor típico del gel, para este tipo de análisis, es de alrededor de 0.5 cm. Tenga en cuenta que el tamaño del orificio en donde se aplicará la muestra, está determinado por el grosor del gel y por el grosor del peine.
4. Una vez que el gel se ha formado, retire el peine y los extremos de la cámara (si estos han sido sellados para la preparación del gel).
5. Coloque el gel con cuidado en la cámara de electroforesis y agregue suficiente solución TBE 1X para cubrir el gel. Evite la presencia de burbujas de aire atrapadas entre el gel y la cámara, así como en los orificios formados por el peine.

2) Evaluación del estado del DNA por electroforesis en agarosa.

a. Reactivos:

1. Agarosa: Tipo II (por ejemplo Sigma, No. Cat. A-6877).
2. Solución stock de tampón TBE 5X; 54 g. de Tris base; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0). Completar con agua hasta 1 litro.
3. Solución de carga del gel 6X: 0,25% Azul de bromofenol; 0,25 de xileno cianol FF. Ambas sustancias están disueltas en solución acuosa de 30% (v/v) glicerol.
4. Solución stock de tinción: Solución acuosa de bromuro de etidio, 10 mg/mL. *¡Atención!* Manipular con sumo cuidado y usar todo el tiempo guantes por que se trata de un agente mutagénico. Guardar esta solución en la oscuridad.

b. Materiales:

Pipetas tipo Eppendorf, puntas desechables; tubos plásticos desechables de 1,5 mL; pequeña cámara de electroforesis en agarosa; fuente de poder; transiluminador con fuente ultravioleta.

c. Procedimientos:

1. Lavar y secar el receptáculo de la cámara en donde se vaciará la agarosa caliente para su gelificación. De acuerdo con el tipo de cámara, puede ser necesario sellar con cinta adhesiva lados opuestos del receptáculo para formar el molde del gel.
2. Diluir suficiente tampón TBE 5X para obtener un volumen adecuado de solución 1x para llenar la cámara de electroforesis y para preparar el gel.
3. Pesar una cantidad adecuada de agarosa en polvo y agregarla a un volumen previamente medido de TBE 1X en un matraz Erlenmeyer de 50 mL para hacer una solución de agarosa al 0,7% (12 a 15 mL hacen habitualmente un volumen de gel suficiente para cámaras de este tamaño).
4. Tapar el matraz con una tapa suelta y calentar la suspensión de agarosa en Baño de maría o en horno microondas hasta disolver la agarosa.
5. Dejar enfriar hasta aproximadamente 60 °C y agregar solución de bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,5 microgramos/mL. Mezclar bien y verter en el receptáculo de molde instalando inmediatamente el "peine" que hará los pocillos en el gel, cuidando que no queden burbujas.
6. Después de gelificado (unos 20 min. a temperatura ambiente), retirar el peine y las cintas adhesivas, si las hubiere, para colocar el gel y soporte en la cámara de electroforesis. Cubrir con tampón TBE 1x observando que el gel quede sumergido unos 3 mm. Agregar bromuro de etidio hasta 0,5 microgramos/mL.
7. Combinar en un pequeño tubo plástico la muestra de DNA, la solución de carga 6X y agua, de modo de obtener unos 15 microlitros de solución de

carga 1X y unos 200 a 300 nanogramos de DNA. Mezclar bien esta solución con pequeños golpes y calentar a Baño de maría durante 5 min a 65 °C. Es recomendable preparar en paralelo una muestra de DNA en buen estado y en concentración bien conocida.

8. Cargar las muestras sumergiendo un poco la punta de la pipeta Eppendorf y dejando caer la muestra en el pocillo.
9. Conectar los electrodos de la cámara a los terminales de la fuente de poder, de modo que el polo positivo quede en el extremo hacia el cual la muestra debe migrar.
10. Encender la fuente de poder y aplicar un potencial de unos 70 volts durante 30 min o hasta que el colorante más rápido se encuentre a aproximadamente 15 mm del borde del gel.
11. Apagar la fuente y desconectar los terminales para luego sacar el gel (¡usando guantes!).
12. Deslizar el gel sobre el transiluminador y encender éste (¡Proteja sus ojos con gafas adecuadas! y ¡También la cara!). Un DNA en buen estado ha penetrado unos 5 mm y concentra aproximadamente un 80% de su fluorescencia en los 5 mm que siguen. Por comparación con la muestra conocida, puede además estimarse el estado y la cantidad de DNA.

3) Preparación de geles de poliacrilamida:

PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA 19:1, Urea 7 M

5 %		75 ml	120 ml	150 ml
Agua dest	ml	Hasta 75	Hasta 120	Hasta 150
Urea	grs	31,5	50,4	63
TBE 10X	ml	3,75	6,0	7,5
Bis/acril 40 %	ml	9,375	15,0	18,75
Temed	µl	100	100	100
PSA 10 %	ml	1,0	1,0	1,0

PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA 29:1

5 %		50 ml	60ml	70 ml	80 ml	100 ml
Agua dest	ml	36	45	50	57	72
TBE 10X	ml	5	6	7	8	10
Bis/acril 30%	ml	8,3	10	12	14	16,7
PSA 10 %	ml	0,5	0,63	0,8	0,9	1,1
Temed	μl	50	63	80	90	110
8 %						
Agua dest	ml	30	37	43	49	61,5
TBE 10X	ml	5	6	7	8	10
Bis/acril 30%	ml	13,5	16	19	21,4	26,7
PSA 10 %	ml	0,9	1	1,2	1,4	1,8
Temed	μl	90	100	120	140	180
10 %						
Agua dest	ml	27,3	33	39	43,8	54,8
TBE 10X	ml	5	6	7	8	10
Bis/acril 30%	ml	16,8	20	23,5	26,75	33,4
PSA 10 %	ml	0,9	1	1,2	1,4	1,8
Temed	μl	90	100	120	140	180
12 %						
Agua dest	ml	24	29	35	39	50
TBE 10X	ml	5	6	7	8	10
Bis/acril 30%	ml	20	24	28	32	40
PSA 10 %	ml	0,9	1	1,2	1,4	1,8
Temed	μl	90	100	120	140	180

Fuente: Dra. Lisbeth Borjas – Universidad de Zulia - Venezuela

3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y ANÁLISIS DE REGIONES HIPERVARIABLES DEL GENOMA.

1) PCR – KIT – RED Extract N – Amp Blood PCR Kits.

1. Colocar los siguientes reactivos en el tubo de PCR de 200 uL. (master mix)

Reactivos	Volumen
Agua de PCR -----	6 µL
Red Extract-N Amp Blood PCR ReadyMix -----	10 µL
Primer 1 Cromosoma Y -----	1 µL
Primer 2 Cromosoma Y -----	1 µL
DNA extraído -----	2 µL
Volumen total -----	20 µL

2. Mezclar suavemente.
3. Colocar en el termociclador con el programa específico para la amplificación de sitios del cromosoma Y.
4. Verificar la amplificación en un gel de agarosa.

Programa de amplificación:

Incubación inicial: 94°C por 5 minutos

94 °C x 1 minuto	} 35 ciclos
58 °C x 1 minuto	
72 °C x 2 minutos	

Etapa de extensión final: 72 °C x 3 minutos

Otra posibilidad:

Silver STR™ III System

Incubación inicial	Primer ciclo de amplificación (10 ciclos)	Segundo ciclo de amplificación (20 ciclos)	Etapa de extensión final	Temperatura final (Hold Step)
96 °C x 2'	94 °C x 1' 60 °C x 1' 70 °C x 1,5'	90 °C x 1' 60 °C x 1' 70 °C x 1,5'	60 °C x 30'	4 °C

Para más detalle ver caracterización de secuencias polimórficas del cromosoma Y.

Los marcadores genéticos analizados son los siguientes: **D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1348, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818, FGA.**

2) PCR del Genoma Total*.

Objetivos:

- Amplificar segmentos del Genoma Humano por PCR Multiplex.

Material y Reactivos:

Diferentes líneas comerciales desarrollaron protocolos de amplificación del genoma entero, a continuación se hace referencia al desarrollado por Molecular Staging, Inc. En su kit repli-g.

Procedimiento:

Descongele el mix 4X y el templado de DNA control en hielo, manteniendo la polimerasa en frío hasta el momento de su uso.

Prepare el mix de acuerdo al siguiente esquema:

Agua estéril	34.5 μ l
Mix4X	12,5 μ l
DNA Polymerase Mix	0.50 μ l
Total	47.5 μ l

La cantidad recomendada de DNA es de 10 ng por reacción en 2.5 μ l. Si es necesario, ajuste el volumen de su muestra con la solución de hibridación de DNA. Utilice el DNA control provisto en el kit como control positivo, y agua como control negativo. Después del PCR corra el producto en gel de agarosa; una mancha clara de DNA aparecerá en cada línea y podría aparecer en el carril del control negativo. Para probar los productos del PCR del genoma total, realice un PCR con un par de iniciadores “primers” que trabajen bien, amplificando los productos del PCR del genoma. Incluya los controles positivos y negativos. No debe presentarse producto amplificado en el control negativo.

Condiciones del PCR del genoma total:

Incubación inicial	Primer ciclo de amplificación (5 ciclos)	Segundo ciclo de amplificación (30 ciclos)	Etapas de extensión final	Temperatura final (Hold Step)
94 °C x 3'	94 °C x 15'' 58 °C x 15'' 72 °C x 20''	94 °C x 15'' 54 °C x 15'' 72 °C x 20''	72 °C x 10'	4 °C

Se espera que el rendimiento sea de 45 µg (±10%) por 50µL de reacción.

Variabilidad Genómica por Microsatélites.

Objetivos:

Identificar la variabilidad del genoma humano por medio de marcadores microsatélites

Material y reactivos:

Material:

Tubos eppendorf para PCR.

Termociclador.

Guantes de látex.

Pipetas 10 ml.

Propipeta.

Centrífuga.

Micropipetas.

Punta de micropipeta.

Cubeta electroforética vertical.

Parafilm.

Reactivos:

Tampón de cargado.

Tampón TE pH 8.0.

Geles de acrilamida 7%; 20%

Nitrato de plata 0.0111 M

Gel Nusieve.

Primers:

D4s1627; D3s3667; D18s844; D19s564

dNTP

Taq DNA Polimerasa

MgCl₂

Agua destilada.

Procedimiento:

Preparación del master mix (mezcla) para PCR, según el siguiente esquema:

	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen un tubo
10xTaq Gold Buffer	10X	1X	1.000
2.5 mM dNTP	2.5 mM	0.2 mM	1.000
20 µM Primers	20 µM	0.5 mM	0.250
20 µM Primers	20 µM	0.5mM	0.250
Taq Gold Polimerasa	5U/µl	0.65 U total	0.100
25 mM MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	0.600
<u>H₂O</u>			<u>4.300</u>
DNA		40 ng	<u>2.5</u>
	Total		10.000

Primers: D4s1627; D3s3667; D18s844; D19s564

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

1 ciclo	95 °C	10 min
45 ciclos	95°C	3 min
	55°C	30 s.
	72°C	45 s.
1 ciclo	72°C	8 min

Los amplicones se pueden guardar indefinidamente a 4 °C, y estos serán visualizados en geles desnaturalizantes a una concentración final de Poliacrilamida al 7%, Tris-HCl (pH=8.8 0,375 M), Persulfato de Amonio (10%)

TEMED (99%), Urea (8M). La corrida se lleva a cabo a 100 voltios a temperatura ambiente durante 5 horas. El revelado de los geles se realiza con Nitrato de plata al 0,0111M.

Los alelos a determinar mediante la técnica que se describe a continuación:

Variabilidad alélica detectada por la técnica de microsatélites.

D4s1627 Dinucleotido STRP

Rango: 181 bp to 201 bp

Alelos: 181, 185, 189, 193, 197, 201

D3s3667 Dinucleotido STRP

Rango: 167bp-183bp

Alelos: 167, 173, 177, 179, 181, 183

D18s844 Trinucleotido STRP

Rango: 185bp-200bp

Alelos: 185, 188, 191, 194, 197, 200

D19s564 Tetranucleotido STRP

Rango: 146bp-178bp

Alelos: 146,150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178

Todos los primers fueron estandarizados a 100 μ M (μ g/ μ l)

***El protocolo (2) fue desarrollado en el Curso Internacional Teórico-Práctico Genética Humana y Genómica, llevado a cabo en el Intituto de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Biología – UMSA, diciembre 2003.**

3) REGIONES HIPERVARIABLES DEL GENOMA

Marcadores STRs autonómicos:

Los loci STRs o repeticiones en tandem cortas, consisten en secuencias de ADN que se repiten y que tienen entre 2 y 7 pares de bases de longitud cada unidad de

repetición. Son abundantes en todo el genoma y son altamente polimórficos, es decir, muestran una alta variabilidad dentro de las poblaciones humanas. Poseen Poder de Exclusión y Poder de Discriminación elevados, capaces de excluir ó no a individuos vinculantes a casos de paternidad y a sospechosos señalados de participar en hechos criminalísticos. Los STRs ubicados en el genoma autosómico Constituyen excelentes marcadores para realizar perfiles de individualidad genética.

Kit	Locus	Ubicación	Sec	Pb	Rangos	Otros Alelos	K562
Triplex CTT	CSF1PO	5q33.3-q34	AGAT	295-327	7-15	6	9-10
	TPOX	2p25.1-pter	AATG	224-252	6-13	Ninguno	8-9
	TH01	11p15.5	AATG	179-203	5-11	9.3	9.3-9.3
Triplex FFv	F13A01	6p24.3-p25.1	AAAG	283-331	4-16	3.2-10	4-5
	FESFPS	15q25-qter	AAAT	222-250	7-14	Ninguno	10-12
	vWA	12p12-pter	AGAT	139-167	13-20	11-21	16-16
Triplex Silver STR	D16S539	16q24-qter	AGAT	264-304	5-15	Ninguno	11-12
	D7S820	7q11.21-q22	AGAT	215-247	6-14	Ninguno	9-11
	D13S317	13q22-q31	AGAT	165-197	7-15	Ninguno	8-8

Para la amplificación a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de los STRs autosómicos, se cuentan con kits comerciales que permiten la amplificación simultánea de los loci en una PCR Múltiplex y que sus productos amplificados pueden ser visualizados por tinción argéntica. En el presente trabajo se describen los kits comerciales de la casa Promega: CTT triplex, FFv triplex y SilverSTR™; utilizados en el curso de especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses de la UMSA.

A partir de una dilución del DNA genómico de 5ng/μl se prosigue con el protocolo de amplificación sugerido por la casa comercial Promega (cuando la muestra es de papel se sustituye la muestra de DNA colocando el papel dentro del tubo y la diferencia se coloca Agua estéril, destilada y deionizada (agua Ultra Pura):

1. Descongelar el buffer STR10X y la solución que contiene los iniciadores o primers (STR 10X Primer Pair) y mantener en hielo.
2. Determinar el número de reacciones a llevar a cabo y calcular la cantidad requerida de cada componente de la mezcla de PCR., agregando el volumen final de cada reactivo según el orden preestablecido a un tubo eppendorf de 0.5 ml. Mezclar suavemente y mantener en hielo.(Mezcla de reacción).
3. Tomar tantos tubos de 0,5 ml como muestras a analizar. Rotular adecuadamente y agregar 22,5 µl de la mezcla de reacción. Colocar 2,5 µl de cada muestra en cada tubo respectivo, mezclar con la pipeta, agregar una gota de aceite mineral y dar un toque de centrifuga.
4. Incluir en la PCR un control positivo (K562) y un control negativo de reacción.
5. Colocar los tubos en el termociclador en el cual previamente se debe haber seleccionado el programa según las condiciones de amplificación recomendadas. A través del programa de transferencia de tecnología de la Universidad de Zulia-Venezuela se recomienda el siguiente programa de amplificación estandarizado para los tres sistemas múltiplex:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	96	2min.
2	94	1min.
3	60	1min.
4	70	1min.30seg.
5	Ir al paso 2 10 veces	
6	90	1min.
7	60	1min.
8	70	1min.30seg.
9	Ir al paso 6 20 veces	
10	60	30min.
11	4	infinito

- 6 Finalmente almacenar los productos amplificados a -20°C.

7 En el momento oportuno, verificar la efectividad de la PCR corriendo las muestras en geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio.

La preparación del gel de agarosa al 2% se realiza por adición de 2.0 g de agarosa a 100 ml de buffer TAE 1X (marcar el volumen). Disolver la agarosa en un microondas. Adicionar en caso necesario agua deionizada precalentada (60 °C) si se hubiese perdido algún volumen por evaporación.

Enfriar la agarosa a 55 °C antes de colocarlo en la cámara electroforética. Preparar 1 lt de buffer TAE 1X para la corrida electroforética. Seleccionar el voltaje de 5 voltios/cm (midiendo la distancia entre los dos electrodos), correr el gel por 2 horas.

Después de la electroforésis, sumergir el gel en TAE 1X conteniendo 0.5 ug/ml de bromuro de etidio por 20' a T° ambiente. Remover la solución de bromuro de etidio y reemplazarlo con agua deionizada para desteñir el gel por 20'. Verificar las bandas de la corrida electroforética usando un transiluminador (302 nm) y analizar los resultados.

Caracterización de los Productos Amplificados:

Una vez verificados los productos amplificados se procederá a caracterizar los loci en una electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% en Buffer TBE 0,5X, y visualizados por tinción con nitrato de plata.

Elaboración del Gel 5 % PAGE de caracterización Alélica

La elaboración del gel implica un proceso de limpiado de los vidrios y la preparación de la solución de acrilamida.

1. Los vidrios deben estar completamente limpios y libre de grasa, para eso se deben tratar con una solución de etanol al 95%.
2. Para evitar que el gel se pegue a los vidrios uno de ellos debe ser tratado con una solución de unión (1 ml de etanol + 5 μ l de ácido acético + 3 μ l de reactivo Bind Silane). Preparar esta mezcla, agitar suavemente y con un papel absorbente esparcir por todo el vidrio la solución, esperar entre 4 y 5 minutos para que seque y eliminar el exceso con etanol al 95%.
3. El otro vidrio se trata con el reactivo Gel Slick™ para prevenir que el gel se adhiera. Con guantes nuevos se colocan entre 1 y 3 ml, esparcirlo por todo el vidrio, esperar 5 minutos a que seque y eliminar el exceso con agua destilada.
4. Preparar un volumen de 120 ml de solución de Bis-Acrilamida para un gel al 5%.
5. Una vez mezclado lo anterior y preparados los vidrios para volcar el gel, se le agregan los catalizadores de la reacción de gelificación, el temed y el persulfato de amonio al 10%
6. Los vidrios deben tener colocados los separadores del mismo espesor del peine (0.4mm). al agregar los catalizadores, mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas.
7. Vaciar la solución sobre una de las láminas de vidrio completamente, dejando un excedente en el recipiente que quedara como control de gelificación.
8. Con mucho cuidado colocar el otro vidrio sobre la superficie del gel, evitando la formación de burbujas y que por contacto el gel se distribuya por todo el espacio formado entre los dos vidrios.
9. Asegurar las dos láminas colocando en los extremos ganchos de papelería e introducir el peine en la posición adecuada.
10. Dejar polimerizar al menos 1 hora, chequear el control de polimerización y al final montar el gel en la cuba electroforética con buffer TBE 0,5 X.

Electroforesis y detección de los productos amplificados:

1. Para llevar a cabo la electroforesis es necesaria la preparación de las muestras y la pre-corrída del gel con el fin de que alcance la temperatura de aproximadamente 50°C. Se ha estimado que se alcanza la temperatura deseada corriendo la electroforesis a 60 Watts fijos por aproximadamente 20 minutos.
2. Las muestras a sembrar deben ser preparadas mezclando cantidades iguales de producto amplificado (2,5µl) y colorante de carga Azul de Bromofenol (2,5µl), en un tubo eppendorf de 0.5 ml. Al preparar las escaleras Alélicas (ladder), hacerlo de la misma manera.
3. Bajar el contenido al fondo del tubo con un toque de centrifuga y llevarlas al termociclador para desnaturalizarlas a 95 °C entre 2 y 3 minutos.
4. Limpiar los pozos donde serán sembradas las muestras para eliminar restos de urea cristalizada y proseguir colocando 5µl de la mezcla en cada pozo rápidamente para evitar que se enfríe el gel.
5. Al finalizar la aplicación se sigue la corrida de la electroforesis con las mismas condiciones de la pre-corrída, hasta que el Azul de Bromofenol migre aproximadamente 34 cms a partir del sitio de aplicación.
6. Luego de la electroforesis se prosigue a remover el gel del aparato de electroforesis. Con mucho cuidado separar ambas láminas de vidrio y retirar los separadores. Colocar el gel en una bandeja o recipiente de plástico para proceder con la tinción.
7. Para la tinción se utilizan una solución fijadora, solución de nitrato de plata al 0.17% y como solución reveladora hidróxido de sodio al 3%, según protocolo propuesto por Santos y cols., en el año 1993.
8. Los alelos para cada marcador serán asignados según el patrón de bandas generado, comparando éste con su respectiva escalera alélica.

Pasos	Solución	Tiempo (minutos)
1	Solución Fijadora CH ₃ COOH 0.5 %/ Etanol 95 %	20
2	Agua Destilada	2
3	Nitrato de plata 0,17 %	20
4	Agua Destilada	1
5	Sol. Reveladora Formaldehído / NaOH 3 %	5
6	Agua destilada	2

4) CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS POLIMÓRFICAS DEL CROMOSOMA Y

El cromosoma Y representa el 2 % del genoma masculino, contiene alrededor de 60 millones de pares de bases (pb). Un 60 % de este ADN está constituido por secuencias polimórficas altamente repetitivas y están confinadas principalmente a la porción heterocromática del brazo largo, desde Yq13 a Yqter, y a la región pericentromérica sugiriendo que estas regiones tendrían una funcionalidad limitada. Debido a la falta de un elemento homólogo (lo que determina una haploidía parcial), la mayor parte del cromosoma Y (95 %) no se recombina (NRY) durante la meiosis. La falta de recombinación determina que todas las secuencias ubicadas en esta zona se hereden como un bloque constituyendo un grupo de ligamiento.

Se han reportado miles de STRs en todo el genoma humano y en el cromosoma Y se ha descrito un número aproximado de 30. El tamaño de la secuencia de repetición varía entre 2-6 pb. Los Y-STRs más usados son: DYS19 (Y27H39), DYS389 I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 y DYS385

Los marcadores se amplificarán en reacciones individuales específicas para cada sistema a partir de 15 ng de ADN genómico en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 1/10 de volumen de Buffer Taq 10X, 1 pmol/µl de cada

oligonucleótido específico para cada locus, 200 μ M de los dntp's, 2 mM de $MgCl_2$ y 2,5 unidades de Taq ADN Polimerasa.

A continuación, se describe las características más relevantes de cinco Y-STR considerados importantes para la tipificación de individuos aplicada a pruebas de paternidad y criminalística:

Locus	Oligonucleótido	U.Rep	Rango
DYS19	F. CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT R. ATG GCA TGT AGT GAG GAC A	(GATA) _n	174-210 pb
DYS390	F. TAT ATT TTA CAC ATT TTT GGG CC R. TGA CAG TAA AAT GAA CAC ATT GC	(CTAT) _n	195-227 pb
DYS391	F. CTA TTC ATT CAA TCA TAC ACC CA R. GAT TCT TTG TGG TGG GTC TG	(CTAT) _n	275-291 pb
DYS392	F. TCA TTA ATC TAG CTT TTA AAA ACA A R. AGA CCC AGT TGA TGC AAT GT	(ATT) _n	236-263 pb
DYS393	F. GTG GTC TTC TAC TTG TGT CAA TCA R. AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G	(GATA) _n	116-132 pb

La verificación de cada PCR se llevará a cabo en geles de agarosa al 2 % teñidos con Bromuro de Etidio.

La caracterización alélica para cada sistema polimórfico se hará a través de una electroforesis de poliacrilamida no desnaturizante al 10 %, excepto para el locus DYS391, que se hará en geles al 8 %.

Los programas para llevar a cabo la amplificación de cada Y-STR se describe a continuación:

Pasos	DYS19		DYS390		DYS391		DYS392		DYS393	
1	94	5'	94°	2'	96°	10'	94°	3'	94°	2'
2	94°	1'	94°	15"	96°	30"	94°	15"	94°	15"
3	58°	1'	58°	15"	64°	30"	58°	15"	58°	15"
4	72°	2'	72°	20"	72°	30"	72°	20"	72°	20"
5	30 veces desde paso 2		5 veces desde paso 2		2 veces desde paso 2		5 veces desde paso 2		30 veces desde paso 2	
6	72°	3'	94°	15"	96°	30"	94°	15"	72°	2'
7	4°	∞	54°	15"	62°	30"	54°	15"	4°	∞
8	Fin		72°	20"	72°	30"	72°	20"	Fin	
9			30 veces desde paso 6		2 veces desde paso 6		30 veces desde paso 6			
10			72°	10'	96°	30"	72°	10'		
11			4°	∞	60°	30"	4°	∞		
12			Fin		72°	30"	Fin			
13					2 veces desde paso 10					
14					96°	30"				
15					58°	30"				
16					72°	30"				
17					28v	al 14				
18					72°	5'				
19					4°	∞				
20					Fin					

Fuente Dra. Lisbeth Borjas – Universidad de Zulia, Venezuela. Especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses – UMSA.

La asignación de los alelos para cada marcador se hará empleando escaleras locus específica y la visualización de los patrones se hará sometiendo los geles a tinción con nitrato de plata, como se describe para los marcadores autosómicos.

4. OTRAS TÉCNICAS LABORATORIALES:

1) Digestión del DNA con la enzima de restricción Hae III

1. Reactivos:

1. Solución de enzima Hae III: Solución adquirible de diversas fuentes en general suministradas a una concentración de 10 unidades por microlitro.
2. Tampón de digestión 10x: Proporcionado junto con la enzima por los proveedores. (ver preparación de soluciones y reactivos).
3. Solución de espermidina: Solución acuosa 25 mM.

2. Materiales:

Pequeños tubos y puntas de pipetas desechables; centrífuga tipo Eppendorf; estufa a 37 °C.

3. Procedimientos:

1. Combinar volúmenes adecuados de muestra, tampón de digestión 10x, solución de espermidina y agua, de modo de obtener una solución tampón 1x; espermidina 2,5 mM; DNA 0,2 microgramos/microlitro y una cantidad total de ADN de 10 microgramos.
2. Agregar algunos microlitros de Hae III, de modo de tener 2 unidades de enzima por microgramo de DNA. Agitar por golpecitos en el tubo y centrifugar durante 10 segundos.
3. Incubar durante unas 12 horas o toda la noche en estufa a 37 °C.
4. Agregar 20 unidades más de enzima, agitar e incubar a 37°C durante 3 horas más.
5. En el caso de tener dudas sobre la eficacia de la digestión enzimática tomar 1/20 de esta solución y llevar a cabo una electroforesis en cámara de electroforesis pequeña de la forma descrita anteriormente. En un DNA bien digerido no debe observarse fluorescencia en la posición que tenía el DNA intacto y un tenue "chorreo" de fluorescencia en el tercio más distante de los pocillos.

6. Si la digestión hubiese sido incompleta agregar 20 unidades de enzima e incubar durante 3 horas más a 37 °C.

2) Precipitación de las muestras digeridas.

1. Reactivos:

1. Solución: 2M de acetato de sodio, pH 7,0.
2. Etanol: Grado proanálisis, enfriado a -20 °C.

2. Equipos:

Centrifuga; bomba de vacío; campana de secado para conectar al vacío.

3. Procedimiento:

Esta etapa tiene como propósito concentrar las muestras a un volumen adecuado para ponerlas en los pocillos de la electroforesis que sigue; además, eliminar algunas sales que afectan la buena migración electroforética del DNA fragmentado.

1. Agregar a cada muestra, 8 µL de solución de acetato, agitar y agregar enseguida 0,3 mL de etanol frío cuidando de mezclar muy bien.
2. Poner las muestras a congelación a -20 °C durante 2 horas.
3. Centrifugar a 12.000 x g durante 10 min y, empleando una pipeta Pasteur adelgazada en la punta, succionar todo el sobrenadante cuidando no tocar el pellet que se ubica en el fondo y en un sector de la pared cónica de los tubos. El precipitado se distingue como pequeñas estrías transparentes.
4. Secar las muestras en la campana aplicando vacío durante 3 a 4 min. Después de secadas, los pellets deben verse aún húmedos, pero los tubos deben haber perdido su olor a alcohol. Es importante no sobresecar las muestras porque esto hace la posterior redisolución muy difícil. Por otro lado, sí queda etanol, la muestra puede flotar y salirse del pocillo de electroforesis.
5. Agregar 20 µL de solución TE y poner los tubos ligeramente inclinados, de modo que la solución bañe el área donde está el pellet. Instalar las muestras en esta posición en un baño a 40 °C, con agitación suave durante 40 min.

3) Separación de los fragmentos de DNA por electroforesis.

1. Reactivos:

Se requieren los mismos reactivos descritos en la primera electroforesis. Además de:

Solución marcadora de tamaño de fragmentos: Por ejemplo, solución de DNA del fago lambda digerido con Hind III (por ej.: Promega No. de catálogo G1711).

2. Materiales:

Cámara de electroforesis en agarosa con receptáculo para geles de 20 cm de largo; fuente de poder.

3. Procedimientos:

La preparación del gel de agarosa debe efectuarse de la misma manera que en la electroforesis anterior, cambiándose sólo los volúmenes para este gel más grande y eliminando la adición de bromuro de etidio a la agarosa. El gel debe tener unos 6 mm de espesor.

1. Agregar a cada tubo de muestra, 4 μ L de solución de carga 6x y agitar con unos golpecitos. Preparar además un tubo que contenga 1 μ g de ADN lambda Hind III, agua y solución de carga 1x.
2. Calentar todo los tubos en Baño de maría a 60 °C durante 5 min y centrifugar durante algunos segundos.
3. Una vez instalado el gel y sumergido en tampón TBE 1x (que ahora no lleva bromuro de etidio) se procede a poner las muestras de la misma forma que se indicara en la electroforesis anterior. Por deformaciones que se producen en la corrida de la muestra, conviene dejar libre el primer pocillo. Poner enseguida las muestras agrupadas en tríos, localizando el hijo al medio. Es importante tomar nota inmediata de la localización de cada muestra. El *standard* de DNA lambda Hind III puede ponerse en el pocillo que se desee.
4. Correr la electroforesis durante 42 horas a 2v/cm (considerando la distancia

entre los electrodos).

5. Concluida la electroforesis, se levanta cuidadosamente el gel con su receptáculo y se desliza inclinando este último en una cubeta que contiene unos 300 mL de TBE 1x y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Incubar a temperatura ambiente durante 40 min con agitación suave y transferir enseguida al transiluminador. La banda de 4,3 kb del DNA lambda Hind III debiera encontrarse a 2 ó 3 cm del extremo del gel. Tomar nota de su posición exacta. Las muestras digeridas con Hae III muestran una tenue fluorescencia hacia el final del gel.

4) Secado del gel.

1. Materiales:

Papel filtro grueso y delgado; secador de geles por vacío (por ejemplo, Biorad Modelo 224); bomba de vacío con sistema de trampas para condensación de líquidos.

2. Procedimientos:

1. Recortar cuatro trozos de papel de filtro delgado y dos de papel grueso de un ancho y largo 2 cm mayor que los del gel. Disponer un trozo grueso sobre la placa porosa del secador y poner encima de éste dos trozos de papel delgado haciendo coincidir los lados. Mojar estas capas con abundante agua destilada.
2. Deslizar con cuidado el gel desde el transiluminador a un vidrio plano o al receptáculo, y de éste al papel humedecido sobre el secador. Cuidar que el gel quede inmediatamente centrado sobre el papel, esto es, con un centímetro de papel sobrando a cada lado del gel. Cortar una pequeña esquina del gel, lo que servirá de marca.
3. Mojar el gel con agua destilada, poner encima una capa de papel *delgado* y eliminar suavemente con los dedos (¡jenguantados!) las burbujas entre

el papel y el gel. Mojar y poner el segundo papel delgado eliminando las burbujas.

4. Mojar y cubrir con el papel grueso.
5. Cubrir con la cubierta de caucho o silicona del secador, hacer vacío y secar durante una hora a temperatura ambiente y luego calentar el secador a 60 °C, para secar 1 hora más. El gel seco puede guardarse durante días o semanas en los mismos papeles, aplastado con un libro para que no se enrosque. Tenga presente que este material aún contiene bromuro de etidio y evite su contacto con la piel.

5) Marcación de la Sonda (CAC)₅ CON ³²P

Esta técnica se presenta como un ejemplo de la marcación de sondas con material radiactivo, el trabajo debe ser de máximo cuidado por el peligro que representa trabajar con material radiactivo.

1. Reactivos:

1. Enzima polinucleótido quinasa: A 10 unidades/ μ L.
2. Solución (CAC)₅: En agua, a una concentración de 25 μ M.
3. Tampón de reacción: Suministrado con la enzima, 10x.
4. ATP gama ³²P: A una concentración de 166 μ Ci/ μ L.
5. Solución TE

2. Materiales:

Instalaciones adecuadas para trabajar con radiactividad (pantallas protectoras, receptáculos de plomo, depósitos para desechos, áreas restringidas, etc.). Es importante el uso de contadores Geiger-Müller, dispositivos electrónicos que nos indican el nivel de radiactividad de una sustancia mediante el recuento del número de partículas subatómicas, como los electrones emitidos por una sustancia.

3. Procedimientos:

1. Poner a descongelar el ATP radiactivo y premezclar en tubo Eppendorf: 4 μ l de agua; 2 μ l de solución (CAC)₅ y, 1 μ L de tampón de reacción.
2. Mezclar con golpecitos y agregar 2 μ L del ATP (¡descartar esta punta adecuadamente!). Mezclar y, con protector de plomo, trasladar adonde está la enzima.
3. Agregar 1 μ L de polinucleótido quinasa y llevar la cápsula de plomo a una estufa a 37 °C. Después de los 10 primeros minutos agitar con golpecitos y continuar incubando durante un total de 35 min.
4. Detener la reacción agregando 90 μ L de solución TE y guardar el tubo con su protección de plomo en el refrigerador a -20 °C.

6) Hibridación de la Sonda Radiactiva al DNA inmovilizado en el gel seco.

1. Reactivos:

1. Solución desnaturalizante: NaOH 0,5 M; NaCl 0,15 M.
2. Solución neutralizante: Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0; NaCl 0,15 M.
3. Solución SSC 20x: NaCl 3,0 M; citrato trisódico 0,3 M, pH 7,0.
4. Solución SSPE 20x: NaCl 3,0 M; NaH₂PO₄ x H₂O 0,2 M; EDTA disódico 0,02 M. Esterilizar.
5. Solución de Denhardt 100x: Para 100 mL, pesar 2g de polivinilpirrolidona (Sigma PVP 40), 2g de seroalbúmina de bovino (Sigma A-4503) y 2g de Ficoll (Pharmacia, M.W. 400.000). Combinar y disolver en agua y llevar hasta 100 mL. Esterilizar por filtración y guardar en freezer.
6. SDS al 10%.
7. Solución de ADN de *E. coli*: 1,5 μ g/ μ L. Esterilizar por filtración, alicuotar y guardar en refrigeración.
8. Solución de sonda (CAC)₅ marcada con ³²P.

2. Materiales:

Bolsas o mangas plásticas de espesor intermedio; selladora de plásticos; contador Geiger portátil.

3. Procedimiento:

1. Sumergir el gel con sus cubiertas de papel filtro en una cubeta con agua destilada y retirar cuidadosamente el papel, observando si en la superficie del gel permanecen pedazos de papel adosados. Si los hubiera, despegarlos frotando suavemente con el dedo.
2. Levantando el gel por un lado, transferirlo a una cubeta con unos 300 mL de solución desnaturalizante e incubar durante media hora a temperatura ambiente con agitación suave.
3. Descartar la solución desnaturalizante, vertiéndola de la cubeta (el gel queda adherido al fondo). Agregar 50 mL de solución neutralizante, agitar brevemente y descartar para luego agregar 300 mL de solución neutralizante e incubar a temperatura ambiente con agitación suave. Descartar esta solución.
4. Tomando el gel por un lado, con una mano en cada esquina, levantarlo y dejar escurrir la solución. Hacer tocar la punta inferior en toalla de papel para retirar más líquido.
5. Depositar el gel sobre una bolsa plástica que se ha abierto recortando el fondo sellado y uno de sus lados. El tamaño de la bolsa recortada debe ser tal que en la cara de la bolsa en que se ha depositado el gel, los bordes del plástico sobrepasen en 3 centímetros los bordes del gel.
6. Cerrar la bolsa sobre su pliegue y sellar con la selladora dos de sus tres lados abiertos.
7. Tratar de sellar a 1 centímetro del borde del gel y hacer un doble sello más afuera.
8. Para comprobar el buen sellado, por el lado aún abierto, agregar 50 mL de una dilución al 6x de la solución SSC 20x. Observar si hay filtraciones y si existen, sellar de nuevo. Descartar el SSC vertiendo desde la bolsa. El gel puede quedar humedecido en SSC durante los minutos que tardarán las operaciones que siguen.

9. Transferir 65 μ L del DNA de *E. coli* a un tubo Eppendorf y poner este en baño María en ebullición durante 5 min y transferir el tubo enseguida al hielo para desnaturalizar el DNA.
10. Preparar 10 mL de solución de hibridación, agregando a un tubo de vidrio estéril con tapa: 6,8 mL de agua estéril; 2,5 mL de SSPE 20x; 0,5 mL de solución de Denhardt 100x; 0,1 mL de SDS al 10% y los 65 μ L del DNA de *E.coli* desnaturado. Si la solución se hubiese enturbiado, incubar durante 5 minutos en un baño a 40 °C.
11. Eliminar los restos de líquido de la bolsa con el gel. Sacar el tubo del baño y secarlo para enseguida verter su contenido en la bolsa.
12. Protegido por una pantalla, tomar 15 μ L de sonda radiactiva y agregar a la solución en la bolsa, cuidando de liberar la sonda con la punta de la pipeta tocando la solución en la bolsa.
13. Protegiendo siempre su cuerpo detrás de la pantalla, apoyar la bolsa sobre el mesón, manteniendo levantado el borde no sellado y con una mano empujar hacia ese borde los bolsones de aire que puedan haber quedado en la bolsa. No se necesita eliminar TODAS las burbujas, ya que al intentarlo usted podría derramar líquido radiactivo.
14. Acercarse a la selladora, que debe encontrarse a su lado y sellar la bolsa con doble sello. Tener presente que al estar el plástico humedecido, el tiempo de sellado es algo mayor, pero que un tiempo excesivo romperá los bordes de la bolsa. Por esta razón efectúe primero el sello más externo, ya que si falla éste aún hay espacio para repetir el doble sello más al interior. Después de sellar invierta la bolsa sobre un receptáculo para verificar la ausencia de fugas. Recorte el exceso de plástico exterior a los sellos y verifique en los recortes la presencia de radiactividad con el contador. Si hay radiactividad, descarte este material en un depósito adecuado.
15. Poner la bolsa en una cubeta y cubrir con agua destilada a 40 °C. Poner la cubeta en un baño a 40 °C con agitación y agitar suavemente durante dos horas y media, sacando e invirtiendo la bolsa unas 4 veces en este tiempo para evitar que las burbujas permanezcan estacionadas en el mismo lugar.

16. A partir de la solución concentrada, preparar 1,2 L de SSC 6x. Sacar la bolsa del baño y con una tijera cortar una esquina de ella. Corte de preferencia una esquina en que uno de los lados esté doblado, no sellado. Esto abre un poco la bolsa y facilita introducir la pipeta Pasteur para retirar el líquido.
17. Retirar el líquido con una pipeta Pasteur provista de propipeta y transferirlo a un tubo estéril con tapa. Esta solución puede guardarse en el refrigerador y utilizarse para hibridar tres veces más.
18. Desde un pequeño vaso de precipitado vierta 20-25 mL de SSC 6x a la bolsa y mueva ésta para lavar el gel. Vierta el contenido a un envase de desechos radiactivos. Repita este lavado y descarte como desecho radiactivo.
19. Corte los bordes de la bolsa y transfiera el gel a una cubeta con 300 mL de SSC 6x. Agite suavemente durante 30 min a temperatura ambiente y descartar la solución. Repetir dos veces más estos lavados de 30 min con SSC. Entretanto precalentar a 42 °C 300 mL de SSC 6x.
20. Transferir la cubeta con el gel escurrido a un baño a 42 °C y sin demora verter por un borde la solución precalentada. Incubar agitando durante 2 min y descartar el SSC.
21. Sacar la cubeta del baño y lavar una vez más con 50 mL de SSC 6x. Tomar enseguida el gel por un borde y contactar el borde inferior con papel filtro para retirar el máximo posible de líquido.
22. Depositar el gel sobre una hoja bien extendida de celofán ("plastic wrap") y depositar encima otra hoja de celofán cuidando que no queden pliegues.

7) Exposición autorradiográfica del gel hibridado.

1. Reactivos:

1. Solución de revelador fotográfico.
2. Solución fijadora.

2. Materiales:

Estuche para exposición autorradiográfica con pantalla intensificadora; película para autorradiografía (por ejemplo, Kodak X-AR); cámara oscura con luz roja; refrigerador a -80 °C.

3. Procedimientos:

1. Depositar el gel con sus cubiertas de celofán, bien estirado, dentro del estuche de exposición. Trazar con un marcador, líneas sobre el celofán que señalen los bordes del gel.
2. En la cámara oscura, sacar una placa radiográfica y, si fuera necesario, cortarla de modo que cubra el gel completamente. Cortar o doblar una esquina de la placa que coincidirá con la esquina cortada del gel. Poner la placa sobre el gel, centrándola bien, para lo cual sirven las líneas a los bordes del gel.
3. Cerrar el estuche y guardar a -80 °C durante toda la noche, si el ^{32}P no está decaído.
4. Restablecer la temperatura ambiente en el estuche. Abrir en la cámara oscura para revelar y fijar la placa.

Recomendaciones:

1. Los geles pueden guardarse para reexposición o para rehibridación con otra sonda. Para evitar el ataque de microorganismos conserve los geles en refrigeración.
2. Los geles pueden ser rehibridados sometiéndolos primero a desnaturalización y luego a neutralización, tal como se indicó.

8) Caracterización genética del sistema HLA. Utilización de oligonucleótidos sintéticos en la detección de polimorfismos. HLA Clase I, Protocolo Reverse Line Strip.

Objetivos:

Caracterizar los genotipos HLA-A por hibridación reversa.

Material y Reactivos:**Material:**

Termociclador.

Micropipetas.

Tips azules y amarillos.

Bandeja de poliestireno para hibridación.

Baño María o estufa a 50°C.

Agitador a 60 rpm.

Pipetas 5-10 ml y propipetas.

Tubos eppendorf para PCR.

Termociclador.

Reactivos:

Master Mix específico para el locus.

Solución MgCl₂, 6 mM

Agua destilada estéril.

DNA ± 10 ng/ml libre de magnesio.

Solución de desnaturalización.

Concentrado SSPE 20X. Contiene fosfato de sodio con NaCl, EDTA y prociclina

150, SDS 20 %.

Sustrato A:

Solución de citrato con peróxido de hidrógeno y prociclina 150.

Sustrato B:

Solución con 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) y dimetilformamida.

Tiras con las sondas alelo específicas.

Streptavidina-HRP.

Procedimiento:

1. Determinar el número apropiado de tubos para PCR incluyendo aquellos para un control positivo y uno negativo por cada amplificación.

2. Pipetee los reactivos en cada tubo para PCR en el siguiente orden.

15µl MgCl₂, 6mM.

30 µl Mastermix

15 µl DNA (concentración 10-15 ng/µl)

3. Cierre bien los tubos, si es necesario con parafilm.

4. Almacene los reactivos nuevamente de 2 a 8 °C.

5. Realice el PCR de acuerdo al siguiente esquema. 35 ciclos:

Incubación inicial	35 Ciclos de amplificación	Etapas de extensión final	Temperatura final (Hold Step)
95 °C x 2'	95 °C x 15'' 60 °C x 45'' 72 °C x 15''	72 °C x 5'	15 °C

6. Inicie el programa, el cual tiene una duración aproximada de 1.6 horas.

7. Retire las tapas evitando crear aerosoles con el contenido de los tubos.

8. A fin de cuantificar o verificar la amplificación, puede sembrar 5 µl en un gel de agarosa al 1.7%.

9. Añadir una cantidad similar de Buffer de desnaturalización (55 µl) e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

10. El amplicón desnaturalizado puede ser almacenado por 1-2 horas a temperatura ambiente, una semana a 4°C o hasta tres meses congelado si no fue desnaturalizado.

Preparación de Buffers:

1. De ser necesario, atempere el concentrado SSPE y el SDS antes de su uso a 50°C en baño de agua a fin de que todos los sólidos precipitados sean solubilizados.

2. Prepare el Buffer de hibridización mezclando 426 ml de agua deionizada, 110 ml de concentrado SSPE, 14 ml de concentrado de SDS, para un total de 550 ml. Mezcle bien si es necesario a 60 °C para asegurar la

homogeneización completa. Etiquete y almacene a temperatura ambiente hasta por 3 meses.

3. Prepare el buffer de lavado mezclando 1228.5 ml de agua deionizada, 65 ml del concentrado de SSPE y 6.5 ml del concentrado de SDS. Mezcle bien y separe el volumen en dos recipientes, ej: 275 ml al recipiente del buffer de estringencia y 1025 ml para el buffer de lavado. Los buffers pueden ser almacenados a temperatura ambiente por 3 meses.
4. El buffer citrato se prepara mezclando 570 ml de agua deionizada y 30 ml del concentrado de citrato. El buffer se puede almacenar hasta por 3 meses a temperatura ambiente.

Hibridización y ensayo de detección.

1. Atempere el buffer de hibridización y el buffer de estringencia a 50°C. Todos los sólidos precipitados deben encontrarse en solución. El resto de los reactivos se mantienen a temperatura ambiente.
2. Caliente el agua del agitador a 50°C, ajustando el nivel del agua de manera que no salpique a la bandeja durante el agitado.
3. Etiquete el número apropiado de tiras al final de las mismas, utilizando un marcador a prueba de agua. Maneje las tiras con pinzas limpias con el cuidado de no exponerlas a la luz por ser fotosensibles.
4. Coloque cada tira en su respectivo pozo con las líneas de las sondas siempre hacia arriba.
5. Añada a cada pozo 5 ml de buffer de hibridización precalentado a 50°C.
6. Añada 70 µl del amplicón desnaturalizado al pozo correspondiente y mezcle moviendo la bandeja hacia atrás y adelante con cada adición.
7. Coloque la tapa de la bandeja e incube por 30 minutos a 50°C en constante movimiento (60rpm) asegurando que no exista salpicaduras de

pozo a pozo. Un poco de peso puede ayudar a que la bandeja no flote ni se deslice.

8. Saque la bandeja del baño de agua y aspire el contenido de cada pozo. Limpiar la tapa con una toalla de papel.
9. Añada 5 ml del buffer de lavado a cada pozo, agite la bandeja por unos segundos y aspire nuevamente la solución.
10. Añada 5 ml del buffer de estringencia atemperado a 50°C a cada pozo y repose la bandeja en el baño de agua a 50°C por exactamente 15 minutos. El tiempo y la temperatura en esta parte del ensayo son críticos.
11. Prepare la solución del conjugado según la siguiente fórmula con no más de 15 minutos de anticipación. (5.3 ml buffer de lavado + 16µl streptavidina) * número de tiras 12.
12. Retire la bandeja del baño de agua y aspire e contenido de cada pozo.

Los siguientes pasos se lleven a cabo a temperatura ambiente y en agitación constante.

13. Añada 5 ml de la solución de conjugado a cada tubo e incube por 15 minutos.
14. Retire la bandeja del agitador y aspire el contenido de cada pozo. Limpie la tapa con toalla de papel.
15. Añada 5 ml del buffer de lavado a cada pozo e incube por 5 minutos.
16. Retire la bandeja del agitador y aspire el contenido de cada pozo.
17. Añada 5 ml del buffer de lavado a cada pozo e incube por 5 minutos.
18. Aspire el contenido de cada pozo y añada 5 ml de buffer citrato a cada pozo para incubar posteriormente por 5 minutos.
19. Prepare la solución de sustrato con no más de 3 horas de anticipación según la siguiente formula y almacene en oscuridad hasta que se requiera. (4.4 ml sustrato A + 400 µl HRP) * número de tiras.

20. Aspire el contenido de cada pozo y añada 5 ml de la solución de sustrato. Agite gentilmente hasta que las bandas aparezcan.
21. Realice 2 lavados con 5 ml de agua deionizada cada uno incubando siempre por 5 minutos.
22. Retire el agua deionizada y añada 5 ml de buffer citrato a cada pozo. Las tiras se hallan listas para el análisis, sin embargo, estas se pueden guardar por 3 días de 2 a 8 °C antes de la interpretación.
23. Un record permanente de las tiras puede realizarse mediante escaneado o fotografiado. Un filtro Wratten 23 A mejorara el contraste. Mantener las tiras siempre húmedas durante el proceso.

Tablas de las regiones de las sondas para HLA-A.

Sondas de HLA-A	Región
Sondas 1-3	A
Sondas 6-9	B
Sondas 10-12	C
Sondas 15-20	D
Sondas 22-28	E
Sondas 33-36	F
Sondas 39-41	G
Sondas 42-47	H
Sondas 48-50	I
Sondas 51-54	J

Señales débiles de sondas asociadas a alelos en HLA-A

Línea positiva	Motivo de sonda	Nombre de la sonda	Comentario
3	YFSTS@31	DB352BSA	Señal Débil en A*3002
6	WDQET @84	HLAA226BSA	Muy leve hibridación cruzada con WDRNT, wdgct, WDLQT; MUY LEVE SEÑAL EN a*03's
10	GETRNV@86	HLAA712BSA	Débil hibridación cruzada con GETRKV.(sonda #11)
11	GETRKV@86	HLAA603BSA	Débil hibridación cruzada con GETRNV (sonda #10)
14	KAQSQ@92	HLAA573BSA	Señal débil en A*03 (considerada en el software)
19	DREN-b@98	HLAA705BSA	Señal débil en general
25	TIQMM@118	HLAA596BSA	Débil en A*3201
27	TIQRM@118	HLAA664BSA	Puede ser débil en A*25/26/68...
28	TVQMM@118	HLAA672BSA	Muy débil señal
33	R-D@138	HLAA685BSA	Débil en A*29 y A*68
35	Q-D@138	HLAA629BSA	Débil en A3201
41	QITORK@165	HLAA632BSA	Débil en A*3002 y A*3201
44	AARVA@173	HLAA244BSA	Débil en A3201
46	EAAHEA@,172	HLAA633BSA	Débil hibridación cruzada con AAHV
48	EQLRA@178	HLAA61BSA	Señal débil en A*3002 y A3201
			** Señales débiles de ciertos alelos pueden enmascarse en combinaciones heterocigotas; una señal fuerte será observada si el otro alelo es positivo para el mismo motivo.

Fuente: Curso, Genética Humana y Genómica, Fac. de Biología, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología.

5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS:

Soluciones y reactivos:

Buffer DLB (1litro)

Mezclar 10ml de Tris-HCl 1M pH 7,4

2ml de NaCl 5M

20ml de EDTA 0,5M pH 8,0

968ml de agua destilada

DTT 1M (20ml)

Mezclar 3,09 gr de DTT

20 ml de agua destilada

EDTA 0.5M pH 8.

Mezclar 186.1 gr EDTA, 800 ml de agua destilada. Ajustar a 8 con NaOH 1N. Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Jugo Azul 6X

(Contiene de azul de bromofenol 0.25 %, de xilencianol 0.25 % y glicerol 30 %):

Mezclar 25 mg de xilencianol, 25 mg de azul de bromofenol y 3.0 ml de glicerol.

Aforar a 10 ml con TE 1X.

Persulfato de amonio 10%:

Disolver 10 gr de persulfato de amonio en 100 ml de agua destilada, conservar a 4°C en recipiente cubierto con papel aluminio.

Proteinasa K 10 mg/ml:

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 ml de agua ultrapura. Dividir en alícuotas de 500 ul y almacenar a -20 °C.

Sarcosil al 20%:

Disolver 20 g de sarcosinato N-laurílico en 70 ml de agua ultrapura y aforar a 100 ml.

SDS al 10%:

Disuelva 10 g de dodecil sulfato de sodio (Lauril sulfato) en 90 ml de agua ultrapura. Caliente a 68°C para facilitar su disolución. Ajuste el pH a 7.2. Complete el volumen a 100 ml con agua. Distribuya en alícuotas.

SEVAG

(Contiene Cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 24:1):

Mezclar 40 ml de alcohol isoamílico y 960 ml de cloroformo. Guardar a temperatura ambiente, protegido de la luz.

TBE 10X

(Contiene Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M)

Mezclar 108 g de trizma base y 55.0 g de ácido bórico disolver en 800 ml de agua destilada y agregar 40 ml de EDTA 0.5 M pH=8.0. Aforar a 1 L.

TE 100X

(Contiene EDTA 100 mM y Tris-HCl 1 M):

Mezclar 25 ml de Tris-HCl 2 M pH 7.5, 10 ml de EDTA 500 mM y 15 ml de agua ultrapura. Esterilizar en autoclave. Esta solución se usa normalmente a 1 X.

Tampón de Digestión

10 mM Tris-HCl (pH = 8.3)

50 mM KCl

2.5 mM MgCl₂

0.1 mg/ml gelatina (Sigma Catálogo No. G2500)

0.45% Nonidet P40 (Sigma Catálogo No. N6507)

0.45% Tween 20

Autoclavar y almacenar en alícuotas a -20°C.

Tampón de lisis

0.32 M sucrosa

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

5 mM MgCl₂

1 % Triton X-100

40% de bis:acrilamida (1:19)

Disolver 380 g de acrilamida y 20 g de bisacrilamida em 500 ml de agua deionizada. Completar el volumen a 1 lt com agua deionizada.

CAPÍTULO V.- ASPECTOS POBLACIONALES Y BIOESTADÍSTICA DE LAS PRUEBAS DEL DNA.

1. INTRODUCCIÓN.

INTERPRETACIÓN DE LA EVIDENCIA

Cuando no corresponde el perfil de DNA del inculcado con la evidencia, ya sea de una prueba forense (mancha de sangre, semen, etc.) o de una prueba de paternidad (supuesto hijo), se excluye de inmediato como responsable. Sin embargo, cuando existe relación entre estos, se debe calcular la probabilidad de que dicha relación se deba al azar, es decir, la probabilidad de que al tomar un individuo al azar de la población, también coincida con la evidencia. Para el cálculo estadístico se utilizan las frecuencias de los alelos según la población de origen del individuo analizado, y existen estos datos para cada marcador y grupo racial (hispano, caucásico, afroamericano, etc.), en Bolivia, sin embargo, recién se está comenzando a realizar los primeros estudios, es importante resaltar que con fines de exactitud y validez se deben utilizar las frecuencias particulares de la población donde se pretende aplicar la prueba, Algunos de los Amp-FLP más utilizados para pruebas forenses y de paternidad ya se han estudiado en algunas poblaciones latinoamericanas como la población argentina, chilena o la más utilizada en nuestro medio, la población mexicana. Las frecuencias alélicas estimadas en estas poblaciones pueden utilizarse para traducir una prueba de forense o de paternidad (Rangel-Villalobos *et al*, 1999). Por ejemplo, en un perfil de DNA donde los genotipos encontrados con los marcadores A, B y C fueron 5/8, 4/11 y 13/13, respectivamente, el primer paso consistiría en estimar la frecuencia de los tres genotipos encontrados. Para esto se consideran las frecuencias de los alelos implicados y se utiliza la fórmula del equilibrio Hardy-Weinberg para determinar la frecuencia de cada genotipo, los cuales finalmente se multiplican para determinar la frecuencia de ese perfil de DNA.^{1, 2, 6}

En un análisis forense, esta información representa la probabilidad de la evidencia asumiendo inocencia (PEI= 0.029) que se empleará posteriormente. Estos

resultados también se pueden traducir en el índice de paternidad ($IP = X/Y$), que nos dice cuántas veces lo observado se explica por relación biológica más que por coincidencia, donde X es la probabilidad del supuesto padre de transmitir los alelos que porta y que también están en el niño (igual a 1), mientras Y es la frecuencia de los alelos en la población general. En este caso, Y se calcula con los alelos que comparten el supuesto padre y el hijo en estudio; si del ejemplo anterior compartieran los alelos 5, 4 y 13 para los marcadores A, B y C, respectivamente, el producto de sus frecuencias equivale a:⁶

$$Y = 0.25 \times 0.30 \times 0.57 = 0.043$$

Por lo tanto,

$$IP = 1 / 0.043 = 23.2.$$

MARCADORES	A	B	C
Fórmula	2pq	2pq	p ²
Alelos encontrados	2(5)(8)	2(4)(11)	(13)(13)
Frecuencia de los alelos	2(0.25)(0.62)	2(0.30)(0.48)	(0.57) ²
Frecuencia final	0.31 x 0.288 x 0.325 = 0.029		
Perfil del DNA	Casi 3 de cada 100 personas		

2. ANÁLISIS DE BAYES

El teorema de Bayes sirve para conocer las probabilidades finales a partir de las probabilidades iniciales dada cierta información adicional. El método proporciona una manera adecuada de incorporar la información posterior obtenida del perfil de DNA a la probabilidad inicial basada en los primeros sucesos del caso, como otras pruebas, testigos, etc.^{1, 2, 23, 24}

En una prueba forense, el teorema se aplica para determinar la probabilidad posterior de culpabilidad ($PPC = 1/1 + P_i(I/C) \times PEI$), donde $P_i(I/C)$ denota la razón inicial (P_i) de

inocencia contra culpabilidad, y se utiliza la PEI antes calculada. Por ejemplo, la razón 50:50 es una posición neutral, donde no se dice si el sospechoso es inocente o culpable, pero la razón puede cambiar hacia ambos lados según se presentan testigos, evidencias, etc. Volviendo al problema anterior, donde se tiene una PEI = 0.029 y una Pi (50/50) = 1, por tanto:

$$Pp = \frac{1}{1 + (50/50) (0.029)} = 0.972$$

En este caso, la PP resultado de una Pi (50:50) es de 97.2%; pero si se tuviera una Pi (I/C) diferente por la declaración de un testigo y fuera a favor de la inocencia [Pi(90:10)], su PPC disminuiría [PPC = 1/1 + (9 x 0.029) = 79.3%], mientras que si la declaración fuera en contra [Pi(10:90)]; su PPC aumentaría [PPC = 1/1 + (0.11 x 0.029) = 99.67%]. Por lo anterior, resulta sumamente importante traducir los primeros hechos de un caso a una razón numérica Pi (I/C), así como definir la PP a partir de la cual se puede considerar que un sospechoso es culpable (Krawczak y Schimidtke, 1994).^{1, 24}

En las pruebas de paternidad es muy frecuente utilizar la probabilidad inicial de paternidad comparada con no paternidad Pi (P/NP) de 50:50, que es igual a 1, por lo cual se puede obviar de la fórmula. Cabe mencionar que existen casos más complejos donde no se aplica lo anterior, y que serán explicados más adelante, en este manual. En el mismo ejemplo, la probabilidad de inclusión de paternidad, conocida como W. se determina utilizando el índice de paternidad antes calculado (IP = 23.2) o los datos que los originaron (X = 1, Y = 0.043).^{1, 5}

$$W = \frac{X}{X + Y} = \frac{IP}{1 + IP}$$

$$W = \frac{1}{1 + 0.043} = \frac{23.2}{1 + 23.2} = 0.959$$

De manera que W indica una probabilidad de 95.9% de que el supuesto padre realmente lo sea.

Existen propuestas aceptadas internacionalmente para la interpretación de W ; por ejemplo, la de Hummel (1971), que utiliza seis rangos que van desde "indicación de paternidad" (70%), hasta "paternidad prácticamente probada" (99.73% o más), y recientemente Lincoln (1993) propuso los siguientes postulados (Castellano M, 1995):²³

- Menos de 80%, paternidad despreciable o inútil.
- 80 a 89.9% cierta insinuación de paternidad.
- 90 a 94.9% paternidad probable.
- 95 a 98.9% paternidad muy probable.
- 99 a 99.7% paternidad extremadamente probable.
- 99.8 a 99.9% paternidad prácticamente probada.

3. DE LA EXCLUSIÓN A LA ATRIBUCIÓN DE PATERNIDAD.-

El resultado de un estudio de paternidad dudosa, puede ser la exclusión del presunto padre, como ya se vio. Antiguamente, este resultado era el único considerado como concluyente; si no existía exclusión de paternidad se consideraba la prueba como no concluyente. Hoy en día, sin embargo, gracias al mayor número de marcadores genéticos en uso (algunos de ellos altamente polimórficos como los STR), existe otra conclusión posible: la asignación positiva o atribución de paternidad.¹

La atribución de paternidad consiste en concluir que el presunto padre es el padre biológico del hijo que se le imputa, con una probabilidad razonablemente alta. Este tipo de conclusión puede obtenerse, cuando no ha habido exclusión de paternidad, una vez que se conocen el fenotipo de la madre, el hijo y el padre putativo y las frecuencias poblacionales de los alelos en cuestión, aplicando la teoría de probabilidades.^{1, 2}

El procedimiento que se sigue para conocer la probabilidad de que el padre putativo sea efectivamente el padre biológico, dado que se conocen los fenotipos de él, del hijo y de la madre, como ya se indicó, se basa en la aplicación del Teorema de Bayes.

Llamaremos F al fenotipo del padre, que se desprende del estudio de marcadores genéticos realizado; H₁ a la hipótesis que considera que el padre putativo es realmente el padre biológico del hijo que se le atribuye; y H₂ la hipótesis alternativa, que considera que el padre putativo no es el padre biológico del hijo en cuestión.

El valor que estamos interesados en conocer es la probabilidad de que el padre putativo sea el padre biológico dados los fenotipos que se han detectado en la madre, hijo y padre putativo y lo denotaremos como P (H₁/F). Aplicando el Teorema de Bayes, podemos estimar esta probabilidad de acuerdo con la siguiente igualdad:

$$P(H_1/F) = \frac{P(F/H_1) P(H_1)}{P(F/H_1) P(H_1) + P(F/H_2) P(H_2)}$$

Si consideramos *a priori* (antes de realizar los exámenes), que es igualmente probable que el acusado sea o no el padre, tenemos las probabilidades *a priori* H₁ = H₂ = 0,5 y podemos simplificar la expresión anterior:

$$P(H_1/F) = \frac{P(F/H_1)}{P(F/H_1) + P(F/H_2)}$$

Si la expresión que está a la derecha de esta igualdad, la simplificamos por P (F/H₂), obtenemos:

$$P(H_1/F) = \frac{P(F/H_1) / P(F/H_2)}{P(F/H_1) / P(F/H_2) + P(F/H_2) / P(F/H_2)}$$

y si denominamos L el cociente:

$$L = \frac{P (F/H_1)}{P (F/H_2)}$$

donde L es una razón de verosimilitud llamado índice de paternidad, ampliamente utilizado, en cuyo numerador está la probabilidad de que el padre putativo sea realmente el padre biológico, y en el denominador la probabilidad de que él no sea el padre biológico, dados los fenotipos que se detectaron en la madre, hijo y en este presunto padre. Si conocemos estas dos cantidades, podemos calcular la probabilidad a *posteriori* de que el padre putativo sea realmente el padre biológico del hijo que se le atribuye.⁵

4. FRECUENCIAS GENICAS DE LAS CARACTERÍSTICAS DETERMINADAS POR UN PAR DE GENES.-

Para calcular las frecuencias de los genes en una población es necesario que el ambiente influya poco en la característica determinada por ellos y que se conozca la forma de transmisión hereditaria de dichos genes. Estas características se cumplen en los grupos sanguíneos, las enzimas y otros marcadores genéticos.

La forma para determinar la frecuencia de los genes en una población determinada es relativamente sencilla; existen dos situaciones: cuando es posible distinguir los individuos heterocigotos de los homocigotos y cuando esto no es posible.

Cálculo de la frecuencia génica por cuenta simple:

Con el fin de obtener la frecuencia génica, como en el sistema MN de los grupos sanguíneos, en donde se puede diferenciar a los heterocigotos de los homocigotos, se utiliza el método de la cuenta génica simple.

Por ejemplo, en una muestra de 100 individuos. 20 son de grupo M, 50 MN y 30 N:

Fenotipo	Número de individuos	Genotipo	Número de genes M
M	20	MM	40
MN	50	MN	50
N	30	NN	0
Total	100		90

Dado que cada individuo tiene dos genes, uno que heredó de padre y otro de su madre, el genotipo de los sujetos será MM, el de los MN, MN, y el de los N, NN. Para encontrar la frecuencia del gen M basta contar los genes M (no los individuos) y dividir esta suma entre el total de genes, o sea habrá 90 genes M de un total de 200 (dos de cada uno de los individuos). La frecuencia es $(90/200) = 0.45$.^{23, 24}

Cálculo de la frecuencia génica con la ley de Hardy-Weinberg.

Para determinar la frecuencia génica cuando no se puede diferenciar a los heterocigotos de los homocigotos se usa un método un poco menos sencillo.

Supónganse que en una población determinada se encuentra que la frecuencia de los individuos afectados por un trastorno autonómico recesivo sea de 0.99. Estas personas son homocigotos aa y no se puede diferenciar los homocigotos sanos AA de heterocigotos Aa, también sanos.

La frecuencia del gen dominante (A) más la frecuencia del recesivo (a) debe ser igual a la unidad. Si se llama p a la frecuencia del primero y q a la del segundo, entonces:

$$p + q = 1$$

Dado que el gen que herede un individuo de su padre es independiente del gen que herede de su madre se puede calcular la frecuencia de individuos AA, Aa y aa multiplicando las frecuencias de los dos genes en los gametos masculinos por los dos femeninos.^{1, 2, 23, 24}

♀	♂	p = A	q = a
p = A		$p^2 = (AA)$	$pq = (Aa)$
	q = a	$pq = (Aa)$	$q^2 = (aa)$

Frecuencias génicas. Ley de Hardy-Weinberg.

Frecuencia del gen A (p) = 0.7

Frecuencia del gen a (q) = 0.3

Individuos AA (49%), individuos Aa (42%), individuos aa (9%).

La relación mostrada en la tabla es idéntica a la figura geométrica de un cuadrado, donde la superficie total, en el universo de la población estudiada, se calcula multiplicando todo un lado ($p+q$) por el otro ($p+q$) y es un producto notable:

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

La frecuencia de los individuos AA es p^2 , la de Aa es de $2pq$ y la de aa q^2 .

Con base en este teorema desarrollado independientemente en 1908 por **Hardy**, un matemático inglés y por **Weinberg**, un físico alemán, se pueden determinar las frecuencias de los genes a partir de la frecuencia de los individuos.

Si q^2 es la frecuencia de los individuos aa, la frecuencia del gen "a" será la raíz cuadrada de q^2 , o sea q . En la población supuesta $q^2 = 0.09$ y $q = 0.3$; p será igual a 0.7 ya que $p + q = 1$. La frecuencia de sujetos AA = p^2 es de 0.49 y la de sujetos Aa = $2pq$ es de 0.42.

Tomando el ejemplo de la fenilcetonuria, donde la frecuencia de sujetos afectados es cercana a 1/10 000, la frecuencia del gen anormal (a) será 0.01 y la del normal 0.99:

Cálculo de la frecuencia génica con la ley de Hardy-Weinberg

Frecuencia de la fenilcetonuria = 1/10 000 = q^2

$$q = \sqrt{1/10\ 000}$$

$$q = 1/100$$

$$p = 99/100$$

Si aplicamos la fórmula: $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, se tiene que:

$$p^2 = 0.9801 \text{ homocigotos normales.}$$

$$2pq = 0.0198 \text{ heterocigotos afectados.}$$

$$q^2 = 0.0001 \text{ homocigotos afectados.}$$

Llama la atención que a pesar de ser poco frecuente la enfermedad, la frecuencia de sujetos heterocigotos, $2pq$, es de 0.0198, casi 2%.

$$\text{Frec. (AA) = 0.9801}$$

$$\text{Frec. (Aa) = 0.0198}$$

$$\text{Frec. (aa) = 0.0001}$$

5. VARIABILIDAD DE LAS FRECUENCIAS GÉNICAS DE UNA GENERACIÓN A LAS SIGUIENTES.

Para averiguar si las frecuencias de una generación a las siguientes cambia se puede aplicar la ley de Hardy-Weinberg. El cálculo implica que para la característica en estudio exista panmixia, es decir, todos los matrimonios o apareamientos ocurran al azar. Nuevamente se sabe que:

La frecuencia del gen A = p

La frecuencia del gen a = q

La frecuencia de individuos AA = p^2

La frecuencia de individuos Aa = $2pq$

La frecuencia de individuos aa = q^2

En el siguiente cuadro se muestran los cálculos algebraicos:

Tipos de familias y sus descendientes en una población.

Tipo de apareamiento	Frecuencia de apareamiento	Hijos		
		AA	Aa	aa
1. AA x AA	p^4	p^4	-	-
2. 2(AA x Aa)	$4p^3q$	$2p^3q$	$2p^3q$	-
3. 2(AA x aa)	$2p^2q^2$	-	$2p^2q^2$	-
4. Aa x Aa	$4p^2q^2$	p^2q^2	$2p^2q^2$	p^2q^2
5. Aa x Aa	$4pq^3$	-	$2pq^3$	$2pq^3$
6. aa x aa	q^4	-	-	q^4

La forma de construir este cuadro es la siguiente:

Frecuencia de apareamientos.

Se multiplica la frecuencia de hombres por la de las mujeres con determinado genotipo. Ejemplo: para el matrimonio 1: $AA \times AA = (p^2)(p^2) = p^4$; para el matrimonio 2: $AA \times Aa = (p^2)(2pq) = (2p^3q)$, pero como en este tipo de matrimonio los varones pueden ser Aa y las mujeres AA ($2p^3q$), este apareamiento es dos veces más frecuente (cruce recíproco):^{1, 2, 23, 24}

$$2p^3q + 2p^3q = 4p^3q$$

Frecuencia en los hijos en los seis tipos de apareamiento.

1. Apareamiento AA y AA: Todos los hijos son AA, por lo que toda la frecuencia p^4 se coloca en esta columna.
2. Apareamiento AA y Aa: La mitad de los hijos será AA y la otra mitad Aa. La mitad de $4p^3q$ es $2p^3q$, que se coloca en su respectiva columna.
3. Apareamiento AA y aa: Todos los hijos son Aa, por lo que $2p^2q^2$ está en esta columna.
4. Apareamiento Aa y Aa: Una cuarta parte de los hijos es AA, la mitad Aa y la última parte aa. A cada columna corresponde, de manera respectiva, p^2q^2 , $2p^2q^2$ y p^2q^2 .

5. Apareamiento Aa y aa: La mitad de los hijos serán Aa y la otra mitad aa; de ahí un $2pq^3$ está en estas columnas.

6. Apareamiento aa y aa: Toda la frecuencia q^4 estará en la columna de hijos aa.

Súmense ahora todos los hijos AA:

$$p^4 + 2p^3q + p^2q^2$$

factorizando se tiene:

$$p^2(p^2 + 2pq + q^2) = p^2(p + q)^2 = p^2(1)^2 = p^2$$

ya que:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 \text{ y } p + q = 1$$

suma de hijos Aa:

$$2p^3q + 2p^2q^2 + 2p^2q^2 + 2pq^3$$

factorizando se tiene:

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

suma de hijos aa:

$$p^2p^2 + 2pq^3 + q^4$$

factorizando:

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

Véase entonces cómo las frecuencias génicas de una generación a la siguiente permanecen constantes, siempre y cuando haya panmixia.

Ejemplo numérico: En una población determinada, la frecuencia de los individuos AA, Aa y aa es de 0.49, 0.42, y 0.09 en cada caso, y la frecuencia del gen A (p) es 0.7 y la del a (q) es 0.3. ¿Cuál será la frecuencia de estos genes en la generación siguiente? Sustitúyanse estos valores en el cuadro siguiente:

Frecuencia de hijos AA, Aa y aa de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg.

Tipo de apareamiento	Frecuencia de apareamiento	Hijos		
		AA	Aa	aa
1. AA x AA	0.2401	0.2401	-	-
2. AA x Aa	0.4116	0.2058	0.2058	-
3. AA x aa	0.0882	-	0.0882	-
4. Aa x Aa	0.1764	0.0441	0.0882	0.0441
5. Aa x aa	0.0756	-	0.0378	0.0378
6. aa x aa	0.0081	-	-	0.0081
Total	1	0.49	0.42	0.09

La frecuencia de los diferentes genotipos en los hijos es igual a la de sus padres en ausencia de matrimonios seleccionados.

6. El teorema de equilibrio de Hardy y Weinberg.

La genética de poblaciones estudia el comportamiento de los genes en las poblaciones y su principal postulado es lo que se conoce como el "Equilibrio de Hardy y Weinberg". Ambos investigadores demostraron, en forma independiente, que en las poblaciones naturales las frecuencias genotípicas corresponden al cuadrado de las frecuencias génicas y que esta composición genética no varía de generación en generación, siempre que se cumplan algunas condiciones. Para comprender este principio, volvamos al ejemplo dialéctico que consideramos anteriormente.^{1, 2, 12}

Supongamos un locus génico, para el cual existen dos alelos en la población: A, con frecuencia relativa p ; y a, con frecuencia relativa q . Si en la población existen p alelos A y q alelos a, significa que en la población de gametos (óvulos y espermatozoides) pueden estar presentes, el alelo A con probabilidad p o bien el alelo a con probabilidad q . Del encuentro entre gametos durante la fecundación, surgen individuos cuyos genotipos respecto de este gen, pueden ser AA, Aa o aa con probabilidades p^2 , $2pq$ y q^2 , respectivamente.¹²

Podemos concluir entonces que en una población natural, en ciertas condiciones, las frecuencias en que se encuentran los genotipos son predecibles a partir de las frecuencias génicas. Con esta información podemos calcular la probabilidad de exclusión para un locus génico dialélico. Si reemplazar, en esta expresión, los valores de probabilidad que corresponden, recurrimos al supuesto

ESPERMATOZOIDES			
FRECUENCIA		A	a
		p	q
OVULOS	FRECUENCIA		
A	p	AA p^2	Aa pq
a	q	Aa pq	aa q^2

Genotipos posibles y su frecuencia poblacional (Equilibrio genético de Hardy y Weinberg).

de que la población se encuentra en equilibrio de Hardy y Weinberg y, por lo tanto, la probabilidad de que una mujer sea de genotipo aa es q^2 y la probabilidad de que una mujer aa tenga un hijo Aa es igual a la probabilidad de que el espermatozoide fecundante sea portador del alelo A, lo cual ocurre con probabilidad p. Hechas todas estas consideraciones, la Probabilidad de Exclusión del sistema es:

$$PE = q^2 \times p \times q^2 = pq^4$$

Una causa teórica de error en la exclusión de paternidad es la ocurrencia de mutaciones; sin embargo este factor puede despreciarse, ya que su frecuencia de ocurrencia es muy baja. Excepciones a esta regla son la frecuencia de mutaciones más altas, entre 0, 0001 y 0, 0004, que se han encontrado en los alelos detectados en mini y microsatélites del ADN. En estos casos, para excluir paternidad se tiene un criterio más exigente en

que es necesario que más de dos bandas (alelos) del hijo, ausentes en la madre, estén también ausentes en el padre putativo, para poder excluirlo. En términos generales, una manera de eliminar al máximo esta posibilidad de error es obtener exclusión de paternidad en más de un marcador genético.^{1, 12}

El uso de un mayor número de loci génicos resulta más eficiente, ya que permite aumentar la Probabilidad de Exclusión de un hombre falsamente acusado de ser padre, de acuerdo con la siguiente igualdad:

$$PE_c = \prod_{i=1}^k (1-PE_i) = 1-(1-PE_1) (1-PE_2) (1-PE_3)....(1-PE_k)$$

Donde PE_c es la Probabilidad de Exclusión conjunta que se obtiene usando k marcadores genéticos y PE_i es la Probabilidad de Exclusión promedio del i -ésimo marcador genético utilizado.

El cálculo de la Probabilidad de Exclusión para un sistema genético en particular resulta muy sencillo si en él existe una sola situación en que la exclusión es posible como vimos anteriormente; sin embargo, cuando son varias las situaciones en que es posible excluir a un hombre falsamente acusado, deben considerarse todas ellas, para obtener una estimación de la Probabilidad de Exclusión global del sistema.^{1, 2, 12}

Para estimar la Probabilidad de Exclusión promedio, de un sistema genético, hay que calcular la Probabilidad de Exclusión para cada combinación madre-hijo posible, multiplicando la frecuencia poblacional del par madre-hijo por la frecuencia del fenotipo paterno incompatible con ella. La Probabilidad de Exclusión promedio del sistema se obtiene sumando las probabilidades de exclusión de todas las parejas madre-hijo.

7. CÁLCULO DE LA PROBABILIDAD DE EXCLUSIÓN:

La ilustración detallada del método para obtener la Probabilidad de Exclusión se expone, a continuación, para un sistema de dos alelos codominantes M y N, cuyas frecuencias poblacionales son m y n, respectivamente:

Para conocer la frecuencia poblacional de cada pareja madre-hijo, es necesario construir un listado de todos los matrimonios posibles y su eventual descendencia: ^{1, 5}

Matrimonios posibles		Frecuencia de los matrimonios	Hijos de estos matrimonios
Padre	- Madre		
MM	MM	m^4	m^4MM
MM	MN	$2m^3n$	m^3n MM y m^3n MN
MM	NN	m^2n^2	m^2n^2MN
MN	MM	$2m^3n$	m^3n MM y m^3n MN
MN	MN	$4m^2n^2$	m^2n^2 MM, $2m^2n^2MN$ y mn^3 MN y mn^3 NN
MN	NN	$2mn^3$	m^2n^2 MN
NN	MM	m^2n^2	mn^3 MN y mn^3 NN
NN	MN	$2mn^3$	n^4NN
NN	NN	n^4	

Hacer un listado de cada pareja madre-hijo posible con su probabilidad de ocurrencia respectiva (la cual se desprende de la tabla anterior); y señalar el fenotipo paterno que es incompatible con ese hijo:

Pareja		Frec	Fenotipo paterno incompatible	Frecuencia de ese fenotipo	Probabilidad conjunta
Madre	Hijo				
MM	MM	m^3	NN	n^2	m^3n^2
MM	MN	m^2n	MM	m^2	m^4n
MM	NN	0	—	—	—
MN	MM	m^2n	NN	n^2	m^2n^3
MN	MN	mn	ninguno	—	—
MN	NN	mn^2	MM	m^2	m^2n^2
NN	MM	0	—	—	—
NN	MN	mn^2	NN	n^2	mn^4
NN	NN	n^3	MM	m^2	m^2n^2

Suma = $mn(1-mn)$

La Probabilidad de Exclusión promedio de este sistema es por lo tanto $mn(1-mn)$. Esta expresión es válida para cualquier locus génico con dos alelos codominantes; por ejemplo: grupo sanguíneo MN, Duffy, Kidd, Polimorfismos de fragmentos de restricción del ADN utilizando sondas monolocus, etc. Se puede demostrar fácilmente que para cualquier valor de m y n distinto de 0, la cantidad $mn(1-mn)$ es mayor que el pq^4 obtenido cuando existe dominancia de un alelo sobre el otro. Podemos concluir entonces, que son más eficientes para excluir paternidad aquellos marcadores genéticos en que no existe dominancia.^{1,5}

Se desprende también de este análisis que la Probabilidad de Exclusión de un sistema depende directamente de las frecuencias génicas. Podemos, por lo tanto, calcular la frecuencia génica en la cual la Probabilidad de Exclusión alcanza su valor máximo, obteniendo la primera derivada de la expresión anterior, reemplazando en ella m por $1-n$ e igualándola a 0:

$$PE = n - 2n^2 + 2n^3 - n^4$$

$$dPE / dn = 1 - 4n + 6n^2 - 4n^3 = 0$$

La solución a esta ecuación es $n = 0,5$; por lo tanto la mayor eficiencia de un sistema dialélico codominante se alcanza cuando ambos alelos tienen frecuencias similares.

Siguiendo el algoritmo detallado anteriormente, se puede demostrar que en sistemas genéticos con tres alelos, uno de ellos recesivo, como ocurre en el grupo sanguíneo ABO, la Probabilidad de Exclusión promedio del sistema es:

$$PE = p(q+r)^4 + q(p+r)^4 + pqr^2(2+p+q)$$

donde p , q y r son las frecuencias génicas de A, B y O, respectivamente.

La eficiencia de un sistema genético para excluir paternidad es mayor mientras mayor sea el número de alelos que existen en la población para ese locus génico, de acuerdo con la siguiente igualdad:

$$PE(k \text{ alelos}) = a_1 - 2 a_2 + a_3 + 3 (a_2 a_3 - a_5) - 2 (a_2^2 - a_4)$$

donde PE (k alelos) es la probabilidad de exclusión promedio de un locus con k alelos codominantes y:

$$a_i = \sum_{k=1}^i P_k^i$$

donde P_k es la frecuencia alélica del alelo k.

Se puede ver que es más informativo un sistema, mientras más alelos existan en él. En este sentido, ejemplos de marcadores genéticos multialélicos son los antígenos del sistema HLA y los polimorfismos del ADN que se refieren a minisatélites y microsátélites. En este caso la Probabilidad de Exclusión alcanza su máximo valor cuando todos los alelos tienen frecuencias similares.^{1, 2, 5}

Llamamos polimórficos a aquellos rasgos genéticos para los cuales existen en la población dos o más alelos, cada uno de ellos en frecuencia apreciable.

Para elegir el conjunto de marcadores genéticos a utilizar, es necesario considerar la eficiencia de cada sistema y el costo que tiene su análisis. Para evaluar la eficiencia a través de la estimación de la Probabilidad de Exclusión es necesario conocer la composición genética de la población de donde proceden los individuos involucrados; para esto es indispensable contar con buenos estimadores de las frecuencias génicas de los alelos a utilizar. Es necesario contar con una base de datos poblacional en este caso para cada región de Bolivia.

La Probabilidad de Exclusión que se puede alcanzar por ejemplo puede ser de un 14% con la sola utilización del sistema ABO; y va aumentando a medida que se agregan más marcadores. La probabilidad de exclusión puede alcanzar un 70% con la utilización conjunta de los sistemas sanguíneos ABO, Rh con 5

antisueros, MNSs, Duffy y Kidd. Esta Probabilidad de Exclusión alcanza un 98% si se agrega el sistema HLA y un 99,9% si se utilizan polimorfismos del ADN.

Es necesario, por lo tanto, comprender la naturaleza de los distintos marcadores genéticos y su distribución a nivel poblacional, para evaluar *a priori* qué conjunto de marcadores elegir con fines de individualización genética.

8. CALCULO DEL ÍNDICE DE PATERNIDAD EN EL SISTEMA ABO.-

Supongamos que la madre, el hijo y el padre putativo tienen fenotipo B. En esta situación se incluyen en realidad cuatro parejas madre-hijo distintas en su genotipo:

- Madre BB, hijo BB
- Madre BB, hijo BO
- Madre BO, hijo BB
- Madre BO, hijo BO

El índice de paternidad final se obtendrá ponderando los índices de paternidad individual de cada una de estas situaciones de acuerdo con sus frecuencias relativas:

Pareja madre-hijo	Frecuencia relativa
- Madre BB, hijo BB	q^3
- Madre BB, hijo BO	q^2r
- Madre BO, hijo BB	q^2r
- Madre BO, hijo BO	$qr^2 + q^2r$
TOTAL	$q^3 + 3q^2r + qr^2$

Calculemos ahora, el índice de paternidad (L) para un hombre de grupo sanguíneo B en cada una de estas parejas madre-hijo.^{1, 5}

Madre BB, hijo BB, padre putativo BO o BB:

El numerador de este índice de paternidad es la frecuencia del fenotipo paterno dentro de los posibles padres, que en este caso son todos aquellos que pueden entregar el alelo B a sus hijos: todos los de genotipo BB y la mitad de los que tienen genotipo BO o AB.

$$N = \frac{q^2 + qr}{pq + qr + q^2} = \frac{q + r}{p + r + q} = q + r$$

ya que $p + q + r = 1$

El denominador del índice de paternidad es $q^2 + 2qr$, por lo tanto el valor final de éste es:

$$L = \frac{q + r}{q^2 + 2qr}$$

Veamos ahora un segundo ejemplo:

Madre BB, hijo BO, padre putativo BO o BB:

En este caso los posibles padres son los que pueden entregar el alelo O, es decir, los de genotipo O y la mitad de los AO y BO, por lo tanto el numerador del índice de paternidad esta representado por la fórmula:

$$N = \frac{qr}{r^2 + pr + qr} = \frac{q}{p + q + r} = q$$

y el denominador es $q^2 + 2qr$, con lo cual el índice de paternidad calculado es:

$$L = \frac{q}{q^2 + 2qr}$$

Madre BO, hijo BO, padre putativo BO o BB:

Los posibles padres en este caso, son aquellos que pueden entregar el alelo B o el alelo O, es decir, los de fenotipo BB, OO, BO y la mitad de los AO y AB, con lo cual el numerador del índice de paternidad en este caso toma el valor:

$$N = \frac{q^2 + 2qr}{q^2 + r^2 + 2qr + pr + pq}$$

Simplificando esta expresión:

$$N = \frac{q^2 + 2qr}{q(q + r + p) + r(r + q + p)}$$

$$N = \frac{q^2 + 2qr}{q + r}$$

El índice de paternidad es:

$$L = \frac{(q^2 + 2qr) / (q + r)}{q^2 + 2qr}$$

Finalmente, el índice de paternidad general, que incluye todas las alternativas genotípicas posibles, compatibles con el trío madre B, hijo B y padre putativo B, es la suma de los cuatro índices de paternidad ya calculados, ponderados por la probabilidad de ocurrencia de cada pareja madre-hijo, lo que lleva como resultado a un índice cuyo numerador es:

$$N = \frac{q^4 + 4q^2r + 3q^2r^2}{q^3 + 3q^2r + qr^2}$$

y su denominador toma el valor $q^2 + 2qr$.

De esta forma y conociendo las frecuencias alélicas de la población se determina el índice de paternidad. Si por ej. Este valor es de 0.89, esto significa que el presunto padre tiene una probabilidad de 89% de ser el padre biológico del hijo en cuestión.

9. Resumen de los parámetros estadísticos de interés forense.

Los marcadores polimórficos utilizados en el estudio genético deben presentar un grado razonable de polimorfismo, es necesario conocer como se distribuyen en la población sus distintas formas alélicas.^{1, 12}

PE representa la probabilidad de exclusión de paternidad. Para los sistemas genéticos codominantes de dos alelos $PE = pq (1-pq)$; donde p y q representan las frecuencias génicas de los alelos bajo consideración. Otro parámetro importante es la Heterocigosidad (H) , indicativo de la cuantía del polimorfismo y de la eficacia de cada marcador, finalmente el polimorfismo de los marcadores genéticos debe darse en varias poblaciones o en toda la población humana.^{1, 12}

Cálculo de la paternidad.-

La exclusión de la paternidad es la demostración científica de que un varón está equivocadamente acusado de una determinada paternidad.

Ejemplos:

Primer caso: El hijo posee un alelo que está ausente en la madre y en el presunto padre, consideremos los siguientes marcadores:

PRESUNTO PADRE	MADRE	HIJO
A	A	AB
A	A	B
B	B	A
O	O	A

- Con los STRs la exclusión definitiva debe basarse por lo menos en dos incompatibilidades.

Segundo caso: En el hijo está ausente un alelo para el cual el presunto padre muestra ser homocigoto:

PRESUNTO PADRE	MADRE	HIJO
MM	MN	NN
SS	Ss	ss
AB	O	O
AB	A	O

Tercer caso: En el hijo está ausente un alelo con el cual necesariamente debió haber contribuido el presunto padre:

PRESUNTO PADRE	MADRE	HIJO
12/11	10/10	9/10
20/22	11/12	10/12
13/13	9/10	9/10
12/9	8/8	10/8

Ahora bien, hablamos de inclusión de la paternidad para hacer referencia a la compatibilidad que ocurre cuando el presunto padre posee todos los alelos de origen no materno presentes en el niño:

PRESUNTO PADRE	MADRE	HIJO
A	O	A
B	O	B
AB	B	AB
O	O	O

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

En este caso la atribución de paternidad consiste en concluir que el presunto padre es el padre biológico del hijo que se le imputa, con una probabilidad razonablemente alta. Este tipo de conclusión puede obtenerse, cuando no ha

habido exclusión de paternidad, una vez que se conocen el fenotipo de la madre, el hijo y el padre putativo y las frecuencias poblacionales de los alelos en cuestión, aplicando la teoría de probabilidades.

El teorema de Bayes.-

El procedimiento que se sigue para conocer la probabilidad de que el padre putativo sea efectivamente el padre biológico, dado que se conocen los fenotipos de él, del hijo y de la madre, se basa en la aplicación del Teorema de Bayes.

Por ejemplo llamaremos F al fenotipo del padre, que se desprende del estudio de marcadores genéticos realizado; H_0 a la hipótesis que considera que el padre putativo es realmente el padre biológico del hijo que se le atribuye; y H_a la hipótesis alternativa, que considera que el padre putativo no es el padre biológico del hijo en cuestión.^{1, 2, 5}

El valor que estamos interesados en conocer es la probabilidad de que el padre putativo sea el padre biológico dados los fenotipos que se han detectado en la madre, hijo y padre putativo y lo denotaremos como $P(H_0 / F)$. Aplicando el Teorema de Bayes, como ya se indicó, podemos estimar esta probabilidad de acuerdo con la siguiente igualdad:

$$\frac{P(F/H_0) PH_0}{P(F/H_0) PH_0 + P(F/H_a) PH_a}$$

CAPÍTULO VI. CONSIDERACIONES FINALES.

1. INFORMACION UTIL SOBRE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Peso molecular de un oligonucleótido:

$$[(AX312.2)+(GX328.2)+(TX303.2)+(CX288.2)]-61$$

NUCLEÓTIDO (PM)	DESOXINUCLEÓTIDO (PM)
A = 329.21 g/mol	dA = 312.2 g/mol
C = 305.19 g/mol	dC = 288.2 g/mol
G = 345.21 g/mol	dG = 328.2 g/mol
T = 287.2 g/mol	dT = 303.2 g/mol

Peso molecular evaluado por el programa OLIGO.

*61 resulta de la formación de los enlaces fosfodiéster, se pierde un proton del extremo 3'OH de la cadena creciente y un pirofosfato del nucleótido entrante.

Factores de conversión:

1 Densidad Optica (O.D.) a 260 nm = 50 µg de ADN genómico.

1 Densidad Optica (O.D.) a 260 nm = 40 µg de ARN

1 Densidad Optica (O.D.) a 260 nm = 30 µg de oligonucleótido

1 nmol de oligonucleótido = $\frac{\text{O.D. a 260 nm} \times 90}{\text{Longitud del oligonucleótido}}$

Longitud del oligonucleótido

Condiciones de almacenamiento para DNA genómico:

Disuelto y con alícuotas en TE 1X a -20°C: Varios años.

Condiciones de almacenamiento para oligonucleótidos:

Liofilizados a -20°C: Seis meses a varios años.

Liofilizados a +25°C: Dos meses a un año.

Disueltos en agua a -20°C: Un mes a seis meses.

Disueltos en agua a +25°C: Una semana a tres meses.

2. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD:

Tóxico: Sustancia que ocasiona daño a la salud, por exposición corta o prolongada, cuando es ingerida, inhalada o absorbida por la piel o mucosas.

Veneno: Sustancia que ingerida, inhalada o absorbida por piel o mucosas,

produce efectos fisiológicos dañinos, frecuentemente irreversibles, al organismo y que en cantidades suficientes ocasiona la muerte.

Los agentes nocivos son de naturaleza química (ácidos, álcalis, etc.), física (Radiaciones X, UV, ionizantes) o biológica (bacterias, virus, etc.). En general, evite el contacto con este tipo de agentes, aun con agentes que se presumen no nocivos. Estos pueden ingresar al cuerpo por vía oral (ingestión), inhalación, absorción cutánea o inyección percutánea con objetos corto-punzantes.

Acrilamida: La acrilamida es venenosa si se introduce al organismo por vía oral, respiratoria y cutánea, aún en piel sana. Ocasiona irritación en ojos y en la piel. La intoxicación severa produce neuropatía periférica, eritema y descamación en las palmas de las manos.

Agentes Biológicos: El trabajo con muestras de sangre no está exento del riesgo de infección con patógenos que pueden introducirse al organismo por vía oral o hematogena. Durante el aislamiento de ADN, use bata y guantes y lávese las manos antes de retirarse del laboratorio.

Bromuro de Etidio: Sustancia mutagénica, carcinogénica y venenosa si ingresa por vía oral, cutánea o subcutánea. Su descomposición por calor, genera óxido nítrico (NO), que en un gas tóxico.

Fenol: Sustancia tóxica si ingresa por vía oral, respiratoria y cutánea. La absorción por piel puede producir efectos rápidos y algunas veces letales. Es un poderoso irritante de piel y mucosas. Los vapores emitidos por calentamiento también son tóxicos. Además es una sustancia inflamable que puede reaccionar con materiales oxidantes.

Luz Ultravioleta: Este agente mutagénico y carcinogénico, ocasiona también irritación e inclusive quemaduras en la piel y daño severo a los ojos. Use vidrios de seguridad y lentes protectores. Evite la exposición innecesaria.

III. SECCIÓN CONCLUSIVA

1. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA GENÉTICA FORENSE

1.1. Pruebas Genéticas

Las pruebas genéticas no solamente son aplicadas a la determinación de la identidad humana y en casos forenses, sino que se constituyen en técnicas válidas en otros campos de la ciencia. Se trata como se vio, de pruebas de laboratorio que estudia el DNA, el RNA o los cromosomas, con el objeto de determinar la presencia o la ausencia de una alteración heredada o bien de variaciones en el DNA, en el RNA o en los cromosomas asociados a un riesgo aumentado de desarrollar una particular enfermedad. Los posibles beneficios que aporta la genética forense pueden ser los siguientes:

a) Beneficios Clínicos. Con éstos se trata de evitar el comienzo de la enfermedad, merced al tratamiento curativo debido al momento y al diagnóstico certero, así como para evitar el peligro de tratamientos inapropiados. Actualmente la Citogenética Humana se constituye en una ciencia con perspectivas importantes no solo en la detección genética de enfermedades sino en su tratamiento a través de la terapia genética.

b) Beneficios Psicológicos Sociales. Tratamiento sintomático para aliviar la incertidumbre, la planificación personal y lograr una mejor vida, además de cumplir con el deseo del paciente de realizarse la prueba.

c) Beneficios para la salud pública. Con la aplicación de las pruebas genéticas se pretende reducir la morbilidad y la mortalidad por enfermedades genéticas, así como la frecuencia poblacional en los tratamientos relacionados con morbilidad y mortalidad.

El desarrollo de la moderna biogenética molecular implica auténticos desafíos en el ámbito de la medicina, la ética y el derecho. Como toda ciencia la genética forense presenta sus limitaciones de aplicabilidad, una de las más importantes es la calidad de la muestra ser analizada, es por ello que los investigadores deben tener el máximo cuidado en la recolección de las evidencias y asegurar adecuadamente el lugar del hecho. Otras desventajas mencionadas y discutidas

son la pérdida de la autonomía de la persona y el principio de no discriminación, que se ven vulnerados con la identidad genética.

1.2. Limitaciones a las pruebas genéticas predictivas

En algunas constituciones políticas existen limitaciones para las pruebas genéticas como el art. 12 de la república Argentina que señala: “Sólo podrán hacerse pruebas predictivas de enfermedades genéticas o que permitan identificar al sujeto como portador de un gen responsable de una enfermedad, o detectar una predisposición o una susceptibilidad genética a una enfermedad, si lo es con fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético apropiado”. En Bolivia recién comienza a legislarse la actividad de la genética forense y se la esta considerando como una prueba de validez científica importante para el esclarecimiento de los hechos.

Por otra parte la cuestión se vincula con un aspecto particularmente conflictivo en estos tiempos: los límites internos y externos a la libertad de terapias. Los primeros -los internos- derivados del propio significado de la actividad médica; los segundos -los externos- derivados de la coexistencia del derecho del médico a la libertad de terapia y de los derechos del paciente.

2. RECOMENDACIONES FINALES PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE EN BOLIVIA.

- 1) El laboratorio de genética forense debera contar con el equipamiento y ambientes adecuados para el ejercicio de la genética forense.
- 2) Los peritos forenses y todo el personal deben ser personas formadas y capacitadas en genética o citogenética humana y en forensica.
- 3) En lo posible se deben cumplir normas de acreditación y certificación a nivel nacional e internacional.
- 4) El laboratorio de genética forense debe estar vinculado en el ámbito legal.
- 5) El LGF deberá contar con todos los manuales de procedimientos pertinentes a su funcionamiento.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1 J.Jesús Guízar, Vásquez; Genética clínica, 3^a. Ed., Manual Moderno, 2003.
- 2 Primorosa Chieri, E.A. Zannoni, Prueba del ADN, 2da. Astrea, 2001.
- 3 Anderson, S. Bankier. A.T., y col., Sequence organization of the human mitochondrial genome, "NATURE", 290: 457- 465.
- 4 F. Rothhammer, M. Moraga et al., mtDNA Analysis of skeletal remains from the archaeological site of Tiwanaku and it's relation to the origin of it's builders, Journal of Antropology, vol. 35, No.2, 2003, pp 269-274.
- 5 R.,Aguírre, L.,Armanet, et.al. Identificación genética y pruebas de paternidad, Universidad de Chile, 2000.
- 6 Borjas, L., Revollo, S., Corach, D., Gómez, S., La huella del ADN en la Identificación Forense, 2004.
- 7 Revollo, S., Rocabado, O., Gómez, S., La biología aplicada a la identificación humana y forensica. UMSA, 2002.
- 8 ALI, S.; MÜLLER, C.R.; EPPLEN, J.T. (1986). DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specif for simple repeats. *Hum. Genet.*, 74, 239-243.
- 9 ARMANET, L.; AGUIRRE, R.; VARGAS, J.; LLOP, E.; CASTILLO, S.; CIFUENTES, L. (1995). Estudios de paternidad aplicando polimorfismo de ADN: Evaluación en relación a los métodos convencionalmente usados en Chile. *Rev. Med. de Chile*, 523: 560-566.
- 10 BELL, G.I.; SEBY, M.J.; RUTTER, W.J. (1982). The highly polymorphic región near the insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295: 31-35.
- 11 CAPÓN, D.J.; CHEN, E.Y.; LEVINSON, A.D.; SEEBURG, P.H.; GOEDEL, D.V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature*, 302: 33-37.
- 12 CHAKRABORTY, R.; JIN, L. (1993). A unified approach to study hypervariable polymorphisms: Statistical considerations of determining relatedness and population distances. En "DNA Fingerprint: State of the Science", Pena, S.D.J.,

- Chakraborty, R., Epplen, J.T. y Jeffreys, A.J., Editores, pág. 153-175. Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza.
- 13 GOODBOURN, S.E.Y.; HIGGS, D.R.; CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. (1983). Molecular basis of the length polymorphism in the human. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 80: 5022-5026.
 - 14 JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in the human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
 - 15 JEFFREYS, A.J.; PENA, S.D.J. (1993). Brief introduction to human DNA fingerprinting. En: "DNA Fingerprint: State of the Science", Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T. y Jeffreys, A.J., Editores, pág. 1-20, Birkhäuser Verlag, Basel, Suiza.
 - 16 JEFFREYS, A.J.; MAC LEOD, A.; TAMAKI, K.; NEIL, D.L.; MONCKTON, D.G. (1991). Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 354: 204-209.
 - 17 MILLER, S.A.; DYKES, A.D.; POLESKY, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16: 1215-1220.
 - 18 MULLIS, K.B. (1990). The unusual origin of the PCR. *Sci. Amer.*, 262: 56-61.
 - 19 NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIN, E.; WHITE, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, 235: 1616-1622.
 - 20 NATIONAL RESEARCH COUNCIL USA (1992). DNA Technology and Forensic Science, National Academy Press, Washington D.C.
 - 21 NEUFELD, P.J.; COLMAN, N. (1990). La ciencia al servicio de la justicia. *Investigación y Ciencia*, N^o 166; 6-14.
 - 22 NÜRNBERG, P.; ROEWER, L.; NEITZEL, H.; SPERLING, K.; POPPERL, A.; HUNDRIESER, J.; POCHE, H.; EPPLEN, C.; ZISCHLER, H.; EPPLEN, J.T. (1989). Dna fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)_n/(GTG)₆: somatic stability and germline mutations. *Hum Genet*, 84: 75-78.
 - 23 Curso Teórico Práctico, Borjas, L.; Revollo, S.; Especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA, 2005.

- 24 Curso Teórico Práctico de Genética Humana y Genómica, Facultad de Biología, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, UMSA, 2003.
- 25 Manual de Laboratorio de Anatomía y Fisiología, Magariños, W.; Torrico, B.; Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA.

ANEXOS

1. GLOSARIO DE TERMINOS DE USO FRECUENTE EN GENÉTICA FORENSE:

Ácido nucleico: Molécula polimérica constituida por nucleótidos.

Alelos: Formas alternativas de un gen o de una secuencia de DNA en un *locus* determinado. Cada individuo puede poseer un máximo de dos alelos distintos en cada *locus*, uno heredado del padre y otro de la madre. En los cromosomas sexuales de los varones existe sólo un alelo en cada *locus*, excepto en la sección pseudoautosómica común a los cromosomas X e Y.

Alu: Familia de secuencias repetidas con más de medio millón de copias en el genoma humano. Se utiliza para poder individualizar el DNA humano.

Aminoácidos: Los bloques formadores de proteínas. Cada aminoácido es codificado por un triplete de nucleótidos.

Amniocentesis: Técnica que se emplea para obtener muestra de líquido amniótico durante el embarazo.

Amplificación: Producción de múltiples copias de secuencias de un DNA específico, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

Amplitype: Sistema comercial para amplificación del *locus* HLA DQ alfa por técnica de PCR.

Anillado: Formación de una doble cadena de ácidos nucleicos a partir de una sola cadena. Formación de complementariedad de bases entre un DNA patrón y los iniciadores "primers".

Anticuerpo: El término correcto es inmunoglobulina. Es una proteína que producen los vertebrados superiores al ser expuestos a una sustancia extraña denominada antígeno. El anticuerpo al unirse al antígeno lo neutraliza. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Estos últimos derivan

a partir de una sola célula, vale decir que todos los anticuerpos son idénticos.

Antígenos eritrocitarios: Proteínas que se hallan en la membrana eritrocitaria y que por acción de anticuerpos específicos producen aglutinación de hematíes. Son la base de los marcadores eritrocitarios ABO, MNSs y Rh.

ASO: Oligonucleótido sintetizado *in vitro*, específico para ser hibridado y poder así detectar un alelo específico.

ATP: Adenosintrifosfato; uno de los bloques de construcción del ARN. Molécula portadora de energía utilizada en numerosas reacciones enzimáticas. No debe confundirse con dATP.

Autosoma: Cromosoma autosómico; cromosoma que no está implicado en la determinación del sexo. El genoma humano en su estado diploide consta de 46 cromosomas: 22 pares de autosomas y 1 par de cromosomas sexuales o gonosomas denominados X e Y. Los cromosomas autosómicos se enumeran empezando por el mayor tamaño con el número 1 hasta llegar al más pequeño. El cromosoma humano más pequeño es el 21 y no el 22 como se creyó inicialmente.

Bacteria: Organismo unicelular sin núcleo. El DNA se encuentra libre en el citoplasma.

Bacteriófago (fago): Un virus que infecta bacterias. Se usan como vectores, pues es posible insertarle DNA que luego podrá ser clonado.

Banco de datos: Colección de perfiles de tipificación del DNA de individuos seleccionados o tomados al azar.

Banda: Es la imagen visual que representa a un fragmento de DNA en una autorradiografía.

Base: Unidades químicas que forman los ácidos nucleicos. Se denominan adenina (A), timina (T), citosina (C), guanina (G). El RNA (ácido ribonucleico) lleva uracilo (U) en lugar de timina.

Bayes, teorema de: Procedimiento estadístico que permite predecir la probabilidad relativa de dos sucesos alternativos.

Biopsia coriónica: Biopsia del corion frondoso que se realiza a partir de la 10^a semana del embarazo para diagnóstico prenatal del feto.

Bromuro de etidio: Molécula orgánica que se une al DNA y que produce fluorescencia bajo la luz ultravioleta. Se usa para poder visualizar la presencia de DNA.

Carcinógeno: Agente que se sabe o se sospecha que causa cáncer.

Corrosivo: Agente químico que destruye tejido y materiales por contacto directo.

cDNA: DNA complementario; DNA sintetizado a partir de ARN mensajero.

Cebador, iniciador (*primer*): Oligonucleótido unido a una cadena de DNA sencilla sobre el que una polimerasa de DNA, generalmente la Taq DNA polimerasa, puede añadir nuevos desoxirribonucleótidos.

Centimorgan (cM): La distancia que existe entre dos *loci* de DNA, determinada en un mapa genético. Un centimorgan de distancia indica que dos marcadores se heredan separadamente con una frecuencia de un 1% por vez. Un cM equivale aproximadamente a una megabase (1Mb). El nombre deriva del genetista T. H. Morgan.

Centrómero: Región especializada del cromosoma a la que se unen las fibras del huso mitótico y por donde actúan las fuerzas de tracción responsables de la separación de las cromátides hermanas de los cromosomas durante la división celular. Divide el cromosoma en dos brazos, designados p (pequeño) y g (grande).

Ciencia forense: Aplicación de métodos científicos a los problemas legales.

Citogenética Humana: Disciplina que se ocupa del estudio de la estructura citológica de los cromosomas y de sus consecuencias, en el ser humano.

Citosina: Base pirimidínica que empareja con la guanina a través de tres puentes de hidrógeno en el DNA.

Clon: Son las células o moléculas idénticas originadas a partir de una célula o molécula única ancestral. Cuando se habla de clonar un gen significa que se ha aislado un gen o parte de él a partir del DNA genómico. El tener un gen clonado significa que podemos producirlo en cantidades sin límite.

Clonar: En ingeniería genética es el proceso de introducir genes de un organismo en otro y la progenie del organismo transformado recibe el nombre de clon.

Codificante: La cadena codificante de un gen tiene la misma secuencia de bases y orientación 5'-3' que la secuencia de RNA mensajero (excepto por el hecho de que U está presente en el RNA en lugar de T). La región codificante de un gen es la porción que es transcripta a RNA mensajero y subsiguientemente traducida a proteína. Los exones llevan información codificante, los intrones no.

Código genético: Conjunto de 64 tripletes de bases (codones) correspondientes a cada aminoácido y a las señales de iniciación y terminación de la síntesis polipeptídica.

Codón: Tres bases de nucleótidos uno al lado del otro ya sea en la cadena de DNA o RNA, que codifican para un aminoácido.

Complementario: La unión específica entre bases púricas y pirimídicas de dos cadenas de ácidos nucleicos. Donde la A (purina) se unirá covalentemente con la T (pirimidina) y la G (purina) con la C (pirimidina) en proporción 1 a 1.

Consultante: La persona referida para recibir asesoramiento genético.

Control: Muestra de referencia de origen cierto. Secuencia de DNA de peso molecular conocido.

Cósmidos: Derivados de los plásmidos. Se usan como vectores para clonar fragmentos de DNA muy largos.

Cromatina: Complejo formado básicamente por DNA y proteínas presente en el núcleo celular. La subunidad básica de la cromatina es el nucleosoma, formado a su vez por 200 pares de bases (pb) de DNA y proteínas histonas y otras, visible por microscopía electrónica.

Cromosoma: Cuerpo filamentososo o en forma de bastón en el núcleo de las células que contienen muchos genes. Consisten en proteínas y largas moléculas de DNA, visibles como entidades morfológicas solamente durante el momento de la división celular.

Cromosoma homólogo: Cromosoma que tiene la misma morfología y el mismo patrón de bandas, contiene los mismos genes y se aparea durante la meiosis.

Cromosoma interfásico: Cromosoma que adopta una estructura extendida en donde coexisten regiones del DNA organizado en fibra de 10 nm y otras regiones organizadas en fibra de 30 nm.

Cromosoma metafásico: Cromosoma visible durante la metafase de la división celular y que está formado por cromátides hermanas.

Cromosoma sexual (gonosomas): Cromosomas X e Y. Determina el sexo. La presencia del cromosoma Y determina el sexo masculino y su ausencia el sexo femenino.

Decodificación: Es la identificación de la función de un gen a partir de una secuencia de DNA.

Delección: Es la pérdida de un segmento de ADN o de cromosoma.

Deriva genética: Fluctuación aleatoria de las frecuencias génicas en poblaciones pequeñas.

Desequilibrio de ligamiento: Cuando en una subpoblación algunos genes se heredan juntos con más frecuencia que lo que se espera, según las leyes de Mendel.

Desnaturalización: Separación *in vitro* de las dos hebras apareadas constituyentes de una doble hélice de DNA.

Dialélico: Variaciones del DNA que muestran sólo dos formas con una frecuencia de más de 1%.

Dicigotas: Mellizos. Se producen a partir de dos óvulos fertilizados por dos espermatozoides diferentes.

Diploide: El número de cromosomas presente en las células somáticas. En el ser humano es de 46, el doble del número presente en las células germinales (haploide).

dNTP: Cualquiera de los nucleótidos trifosfato (ATP, TTP, GTP o CTP).

DNA: Ácido desoxirribonucleico. Es el material genético de los organismos, compuesto por cadenas de nucleótidos complementarios en forma de doble hélice.

DNA conservativo: DNA que se ha conservado a lo largo del tiempo. El hecho de hallar secuencias de DNA en un vasto rango de organismos filogenéticamente distantes sugiere que tienen un significado funcional muy relevante, ya que es raro que durante la evolución estas secuencias no se hayan modificado. Por ejemplo, el protooncogen *-ras-* que se ha conservado invariable en organismos tan divergentes como las levaduras y los humanos.

DNA de cadena sencilla: Molécula de DNA que no está apareada con su complemento, ya sea producida artificialmente en el laboratorio o de forma natural por algunos fagos (fagos filamentosos).

DNA genómico: Es el DNA cromosomal de la célula de un organismo.

DNAmt: DNA mitocondrial. Pequeña molécula de DNA circular contenida en la mitocondria.

DNA polimerasa: Enzima que favorece la replicación del DNA. Ver Polimerasas.

DNA sin sentido: Es una de las dos cadenas del DNA que va a dar lugar al RNAm encargado de la síntesis proteica (también denominado RNAm con sentido), pues existe otro RNAm que se llama "sin sentido" y cuya función es la inhibición génica.

Dominante: Alelo dominante es aquel que manifiesta de forma plena el fenotipo determinado por él aun cuando se halle en un estado heterocigoto. Los alelos cuya expresión fenotípica están enmascarados por el alelo dominante, se denominan alelos recesivos.

EDTA: Etilendiaminotetra acético (ácido); compuesto químico que tiene la propiedad de quelar cationes bivalentes, como el ion magnesio (Mg^{+2}). Es muy utilizado en disoluciones empleadas en genética molecular con el fin de inhibir la acción de las nucleasas, que en general requieren Mg^{+2} o Ca^{+2} para ser activas.

Electroforesis: Técnica para separar en un gel, mediante un campo eléctrico, los distintos componentes de una mezcla de moléculas. (Proteínas, DNA o RNA).

Enzimas de restricción: Son las enzimas que cortan las moléculas de DNA en una particular secuencia de bases (punto diana).

Evidencia: Prueba con valor judicial.

Exclusión: Referido a la prueba de tipaje de DNA, es cuando el genotipo del sospechoso difiere del encontrado en la prueba analizada. Lo mismo si se trata de una prueba biológica de paternidad. El sujeto no forma parte de los posibles contribuyentes a una muestra de DNA.

Exón: La región del DNA que genera la parte del RNA precursor que no se escinde durante la transcripción en forma de RNA mensajero, lo cual especifica la estructura primaria del producto génico.

Expresión génica: Proceso en que la información codificada por un gen se convierte en las estructuras constituyentes y funcionales de la célula. Un gen es expresado tanto si es transcrito a RNA como producto final, como en el caso de los RNAr o RNAt, como si es transcrito inicialmente a RNAm y posteriormente traducido a proteína.

FBI: Federal Bureau of Investigation, organismo de Seguridad Federal de Estados Unidos, con sede en Virginia, Maryland, y agencias en muchos otros lugares.

Fenotipo: Expresión morfológica, bioquímica o funcional del genotipo.

Fingerprint: El DNA *fingerprint* se obtiene a partir del polimorfismo del DNA satélite *multilocus*.

Forense: Se refiere a determinaciones, análisis o pruebas científicas que se utilizan en el ámbito legal. Relativo a la ley. Especialistas forenses son quienes realizan ensayos o pericias que luego se presentarán en un juicio.

Frecuencia: Número de individuos o medidas de un tipo respecto al total de la población. Se puede entender como proporción, fracción. En una población de 1.000 individuos hay 50 con ojos azules. La frecuencia de ojos azules en esa población se calcula $50/1.000$ ó $0,005$.

Frye, principio de admisibilidad: Norma jurídica estadounidense que regula la admisión de pruebas basadas en métodos científicos. Estipula que sólo se admiten aquellas técnicas y métodos que gozan de consenso entre los especialistas. Antes de incorporar una prueba obtenida con un nuevo sistema, se celebrarán audiencias preliminares en las que testifican distintos especialistas de la materia de que se trate. El juez decide si se admite o no la prueba.

Gameto: Célula reproductora femenina (óvulo) o masculina (espermatozoide) con un juego haploide de cromosomas. La fusión de dos gametos produce un genoma diploide.

Gel: Matriz semisólida (generalmente agarosa o acrilamida) usada en electroforesis con la finalidad de separar moléculas.

Gen: Es la secuencia de nucleótidos de DNA que codifica para un polipéptido.

Gen candidato: Es el gen marcador que puede utilizarse para iniciar la búsqueda en un trastorno genético desconocido, del cual es su base genética; por ejemplo, el gen miosina en los desórdenes musculares.

Genética molecular: Ciencia que estudia los genes a nivel molecular.

Genoma: Dotación génica o secuencia de DNA característica de una especie.

Genoma mitocondrial: Pequeña molécula de DNA circular contenida en la mitocondria.

Genoma nuclear: Grupo de moléculas de DNA contenidas en el núcleo celular.

Genotipo: Constitución hereditaria fundamental; distribución de genes en un organismo dado. La totalidad de los genes que acarrea un individuo.

Germinal: Línea celular que da lugar a las células reproductivas.

Grupo sanguíneo: Clasificación de la sangre de acuerdo a los antígenos de superficie presentes en eritrocitos, por ejemplo, ABO.

Guanina: Base nitrogenada purínica.

Haploide: Que tiene una sola serie de cromosomas, se refiere al número gamético de cromosomas.

Haplotipo: Grupo de alelos procedentes de *loci* estrechamente ligados, heredados normalmente como una unidad; por ejemplo, HLA.

Heterocigosis: Medida del grado de información que aporta un marcador en la población. Depende tanto del número de alelos como de sus frecuencias respectivas en la población. Cuanto mayor sea el número de alelos que contenga un *locus* determinado o un marcador, tanto mayor será su heterocigosis.

Heterocigoto: Un individuo es heterocigoto para un carácter, gen o marcador cuando tiene dos alelos diferentes en un *locus* determinado en un par de cromosomas homólogos.

Hibridación: La reasociación de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos, nucleótidos o sondas.

Híbrido/a: Una línea celular híbrida es aquella formada por la fusión de dos líneas celulares procedentes de especies distintas. Un dúplex de DNA híbrido es una molécula generada experimentalmente que consiste en una cadena sencilla de DNA apareada a otra molécula de DNA de cadena sencilla o de RNA y cuya secuencia de bases es similar o idéntica. Un individuo híbrido es un individuo resultante del cruzamiento de dos progenitores genéticamente distintos.

Hipervariable: Región o *locus* cromosómico con muchos alelos o versiones.

HLA: Antígenos leucocitarios humanos. Estructura formada por proteína-azúcar, que se halla en la superficie de la mayoría de las células, que difieren entre los individuos y son importantes en la aceptación o rechazo de injertos de tejidos o trasplantes de órganos; el *locus* de una clase en particular denominado, HLA DQ alfa, se usa para análisis forenses con PCR.

Homocigoto: Un individuo es homocigoto para un carácter, gen o marcador cuando tiene dos alelos idénticos en un *locus* determinado en un par de cromosomas homólogos.

Imputado: Acusado, sospechoso, al que se hace responsable de una acción o delito.

Intrón: Regiones del DNA que generan la parte del RNA precursor, el cual es escindido durante la transcripción y que no forma RNA mensajero, y que por lo tanto no especifica la estructura primaria del producto génico.

Inflamable: Sustancia volátil que en condiciones ambientales determinadas, adquiere la capacidad de autoignición.

Juicio: Proceso legal.

Jurado: Conjunto de personas que se pronuncian sobre la culpabilidad o inocencia de un individuo en un juicio.

Kb: Es la abreviatura para describir 1.000 pares de bases (pb) de DNA.

Ligamiento: Tendencia de algunos genes a heredarse juntos por encontrarse en el mismo cromosoma. Se produce segregación conjunta entre ciertos genes con mayor frecuencia. Se debe a la supresión de recombinación meiótica.

Litigio: Disputa legal.

Locus (plural loci): El lugar físico que ocupa un gen para un carácter dado en el cromosoma. En los organismos diploides puede ser ocupado como máximo por un par de alelos distintos, uno paterno y otro materno.

LOD score: Medida LOD. Medida estadística de la probabilidad relativa que tienen dos *loci* de estar ligados.

Mapa citogenético: Mapa de bandas claras y oscuras de los cromosomas metafásicos derivadas de la tinción con quinacrina o Giemsa.

Mapa de restricción: Mapa de la posición de los sitios de corte por las enzimas de restricción a lo largo del DNA.

Mapa físico: Mapa de la distancia física entre distintos marcadores. La distancia suele expresarse en pb (pares de bases) y sus múltiplos son Kb (kilobase) y Mb (megabase).

Mapa génico: Mapa de la posición de los genes.

Marcador: Cualquier alelo de interés en un experimento.

Mb: Megabase = 10^6 bases del DNA.

Meiosis: Tipo de división nuclear, generalmente dos divisiones celulares sucesivas, que da lugar a células hijas con el número haploide de cromosomas.

Metafase: Etapa de la mitosis o la meiosis en que los cromosomas homólogos han alcanzado su condensación máxima y se encuentran

alineados en el plano ecuatorial de la célula, enlazados a la fibra del huso.

Minisatélites: Segmentos de DNA repetidos que comprenden cortas repeticiones en tándem dando lugar a los VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Un tipo de polimorfismo cuyo largo es aproximadamente de 1-30 Kb. Los VNTR pueden ser de dos tipos: simple *locus* o *multilocus*, este último es utilizado para construir el DNA *fingerprint* de un individuo.

Mitocondria: Organela celular propia de las células eucariotas. Poseen un DNA propio.

Mitosis: Proceso de división celular que origina la formación de dos células genéticamente idénticas a la célula parental.

Multifactorial: Fenotipo determinado por muchos factores, tanto genéticos como ambientales, cada uno con efectos aditivos.

Multilocus: Se refiere a una sonda que reconoce distintos sitios dentro del genoma. La huella génica descrita por A. Jeffreys se obtuvo utilizando sondas *multilocus*. La sonda 33.15, procedente de una secuencia de 16 pares de bases de un intrón del gen de la mioglobina, y con 26 repeticiones, se puede utilizar para marcar simultáneamente varias regiones hipervariables del genoma.

Mutágeno: Agente que causa alteraciones en el material genético.

Mutación: El cambio de un gen de una forma alélica a otra. Cambio heredable en la secuencia del DNA de un cromosoma.

Mutación puntual: Alteración de un nucleótido en el DNA cromosomal que consiste en la adición, delección o sustitución de nucleótidos.

Mutágeno: Agente físico, por ejemplo, rayos X, o un agente químico que induce cambios en el DNA.

Nucleósido: Molécula compuesta por una base purínica o pirimidínica unida covalentemente a una ribosa o desoxirribosa.

Nucleótido: Molécula compuesta por un nucleósido unida covalentemente a un grupo fosfato. Los nucleótidos son los bloques básicos de construcción de los ácidos nucleicos.

Oligonucleótido: Pequeñas secuencias de nucleótidos (10-50) sintetizados químicamente.

Oligonucleótidos específicos de alelos (ASO): Son oligonucleótidos que han sido construidos a partir de secuencias de DNA homologas a alelos específicos. Se pueden construir dos oligonucleótidos (ASOs) que difieran solamente en una de las bases, de allí la posibilidad de distinguir un alelo mutado con una mutación puntual de su forma salvaje o normal.

Padre alegado: Es la persona que reclama la paternidad biológica del niño.

Padre legal: Es la persona a la cual la ley le adjudica el carácter de tal. No es necesario que sea el padre biológico.

Palíndromo: Secuencia de DNA idéntica en ambas direcciones; por ejemplo: 5' -GTCGAC- 3' y 3' -CAGCTG- 5'.

Pares de bases (pb): Unidad de medida del DNA. Formada por la base de un nucleótido y su complementaria; por ejemplo, adenina (A) se unirá con la timina (T) o la citosina (C) con la guanina (G).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Proceso que se realiza *in vitro* y que produce millones de copias del DNA deseado a través de la repetición de ciclos a partir de una reacción que involucra a la enzima DNA polimerasa denominada *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerasa).

Pericia: Así se refieren los forenses a pruebas o ensayos científicos que entran a formar parte de un proceso judicial.

Pesquisa: Búsqueda por pasos que consigue recopilar información sobre un hecho criminal.

Pirimidina: Un tipo de bases orgánicas que se encuentran en los ácidos nucleicos.

Plásmido: Elemento de DNA extracromosómico circular que se replica en forma independiente de la célula huésped. Molécula de DNA circular presente en bacterias y con capacidad autónoma independiente a la del cromosoma bacteriano, y que no es necesaria para la supervivencia de la célula bacteriana. Suelen contener genes que confieren resistencia a fármacos en las bacterias que los contienen.

Población: Cualquier grupo de individuos de una especie que ocupa un área dada al mismo tiempo.

Población panmítica: Una población donde el intercambio poblacional se hace al azar.

Poliacrilamida: Polímero sintético utilizado en la construcción de geles para la separación electroforética de DNA o de proteínas.

Polimerasas: Enzima que cataliza la formación de DNA o de RNA a partir de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, respectivamente (DNA-polimerasa, RNA-polimerasa).

Polimorfismo: Diferencias en las secuencias de DNA entre individuos. Presencia de dos o más alelos en una población. En la práctica, un *locus* genético se considera polimórfico si su frecuencia es por lo menos de 0.01 de tal forma que individuos heterocigotos portadores de este alelo puedan detectarse en el 2% o más de la población.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP): Polimorfismo derivado de la presencia o ausencia de una diana para una determinada enzima de restricción.

Portador: Individuo que es heterocigoto para un alelo mutante, causante de un trastorno genético, ya sea en estado homocigoto o hemicigota (el hemicigota tiene una sola copia del gen).

Primer (cebador o iniciador): Pequeña secuencia de DNA, que se aparea con una cadena de DNA, donde la DNA polimerasa inicia la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

Probabilidad: Instrumento estadístico para estudiar la posibilidad de la ocurrencia de un episodio o fenómenos inciertos.

Probabilidad de exclusión *a priori* de un marcador: Porcentaje de individuos falsamente implicados cuya participación quedaría excluida en base a ese marcador o sistema. Depende del polimorfismo del sistema. Cuanto más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, tanto mayor será la probabilidad de exclusión *a priori*. Da una idea de la eficacia de un sistema.

Proyecto Genoma Humano: Esfuerzo internacional para construir mapas físicos y genéticos. Secuenciar el genoma humano y el de otras especies modelo.

Raza: Etnia. Individuos que comparten caracteres genéticos.

Recesivo: En organismos diploides, un alelo que se manifiesta fenotípicamente en su estado homocigótico, pero no en el estado heterocigótico, puesto que el alelo dominante lo enmascara (oculta).

Recombinante: Molécula de DNA nueva generada en el laboratorio como consecuencia de la ligación de dos moléculas de DNA procedentes de genomas o *loci* distintos.

Región minisatélite: Área del cromosoma que contiene una alta densidad de DNA repetitivo.

Repeticiones en tándem: Múltiples copias de una misma secuencia de DNA alineadas en serie.

Restricción, fragmentos de: Secuencias de DNA delimitadas por enzimas de restricción. Productos de la acción de enzimas de restricción.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): Variaciones en el largo de fragmentos de DNA producidos por las enzimas de restricción y que cortan un *locus* polimórfico.

RNA: Ácido ribonucleico; molécula polimérica formada por la combinación de 4 tipos distintos de ribonucleótidos: ácido adenílico (A), citidílico (C), guanílico (G) y urídico (U).

Sanger: Método de secuenciación de **DNA** que recibe el nombre de su descubridor, basado en la utilización de didioxinucleótidos para producir la terminación durante la síntesis *in vitro* de DNA.

Satélite: Secuencias repetidas presentes en los extremos de los cromosomas.

Secuencia complementaria: Secuencia de DNA de cadena simple capaz de aparearse con otra secuencia de cadena simple para formar una doble hélice de DNA. Por ejemplo, la secuencia 5'-TCGAGGTT-3' es complementaria a la secuencia 5'-AACCTCGA-3'.

Secuencia de DNA: Orden relativo de bases, ya sea de un fragmento de DNA, de un gen, de un cromosoma entero o de todo un genoma completo.

Secuenciación: Determinación del orden de nucleótidos o bases en una molécula de DNA o RNA o del orden de aminoácidos en una proteína.

Secuencias repetidas en tándem: Diversas secuencias de DNA, ya sean idénticas o similares, dispuestas de forma adyacente y con la misma orientación en el genoma.

Selección: En genética poblacional, acción de las fuerzas que determinan la ventaja selectiva relativa de un genotipo en la población, afectando así la frecuencia del alelo en cuestión.

Semen: Mezcla de células sexuales masculinas o espermatozoides y líquido seminal producto de las glándulas accesorias.

Somático/a: Célula somática es cualquier célula del organismo que no sea una célula germinal. Mutación somática es una mutación que ha ocurrido en cualquier célula que no sea una célula germinal.

Sonda molecular: Fragmento de DNA marcado que se utiliza para identificar secuencias de bases complementarias.

Sonda monomórfica: Secuencia de DNA que se reconoce en la mayoría de los individuos. Si se digiere el DNA con una enzima determinada, y se hibrida con una sonda monomórfica, se obtiene un marcador que puede servir como control en una prueba con muestras de origen desconocido.

Sonda *multilocus*: Sonda de DNA capaz de detectar variaciones genéticas en múltiples lugares. Un autorradiograma de sonda *multilocus* produce un patrón de más de 30 bandas por individuo.

Sonda *single locus (unilocus)*: Sonda de DNA que detecta variantes en el DNA en un solo sitio del genoma. Un autorradiograma que utiliza una sonda *single locus* o *unilocus* generalmente muestra una banda en los homocigotas y dos bandas en los heterocigotas.

***Southern*:** Técnica de transferencia de moléculas de DNA separadas por electroforesis a una membrana de nylon o nitrocelulosa, seguida de su fijación y análisis por hibridación molecular.

***Splicing*:** Eliminación de los intrones del transcrito primario y unión de los exones para crear el ARN mensajero maduro.

STR (*Short Tandem Repeat*): repeticiones de dos, tres, cuatro o hasta seis nucleótidos. Se utilizan para investigar DNA. Son de gran uso en caso de DNA degradado. Se amplifican varios STR simultáneamente y luego se detectan mediante electroforesis.

STS (*Sequence Tagged Site*): Secuencia de referencia; secuencia de DNA corta (200-500 pb) única en el genoma de la especie en estudio y cuya secuencia de bases es conocida y recuperable físicamente a partir de DNA mediante PCR. Se denomina EST a un STS que ha sido obtenido a partir de DNAc. Los STS sirven de referencia entre distintos laboratorios de investigación para la construcción de mapas físicos o genéticos y para la secuenciación del genoma.

Tablas de Punnett: El diagrama en tablero de ajedrez utilizado para analizar la segregación de los alelos.

Taq-polimerasa: DNA-polimerasa termoestable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*.

TATA-box: Secuencia de DNA formada habitualmente por 5'-TA-TAA-3' contenida en muchos genes y que es importante para la formación del complejo de iniciación en la transcripción del DNA.

Telómeros: Extremos de los cromosomas.

Teratógeno: Agente que se sabe o se sospecha que ocasiona daño al feto.

Timina (T): Base de pirimidina del DNA que se aparea con adenina.

Transposón: Una secuencia de DNA que da lugar a que uno o más genes puedan moverse de un cromosoma a otro.

Vestigio biológico: Pequeñas cantidades de material orgánico que se analizan mediante tiraje de DNA.

Vector: En ingeniería genética, porción de DNA o elemento genético capaz de replicarse en una bacteria. Los vectores más difundidos son los plásmidos y los bacteriófagos.

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats): Unidades repetidas de secuencia de DNA, donde el número es variable entre los individuos.

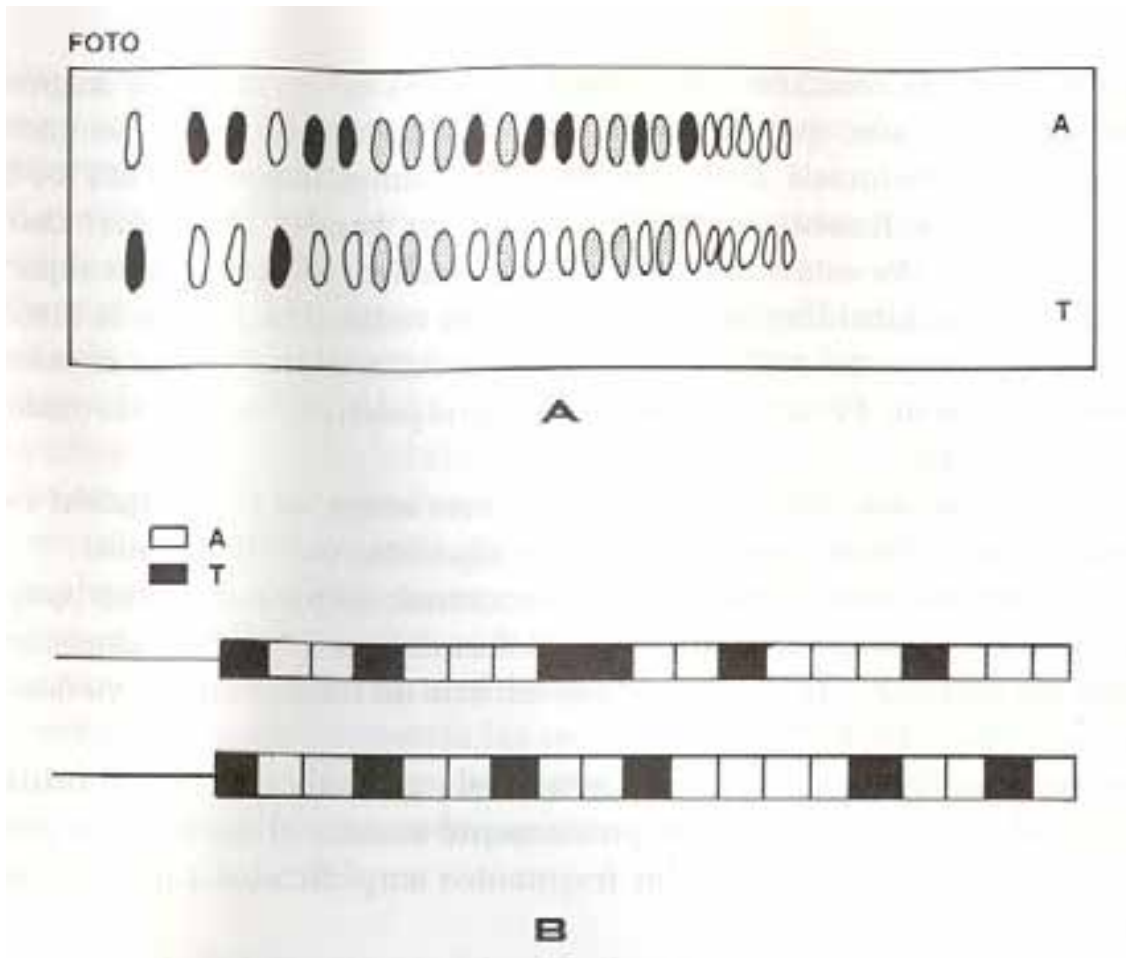


Figura 1.3. Resultados de MVR-PCR. (A). Electroforesis. (B) Distribución de unidades A y T compatibles con la corrida de electroforesis.

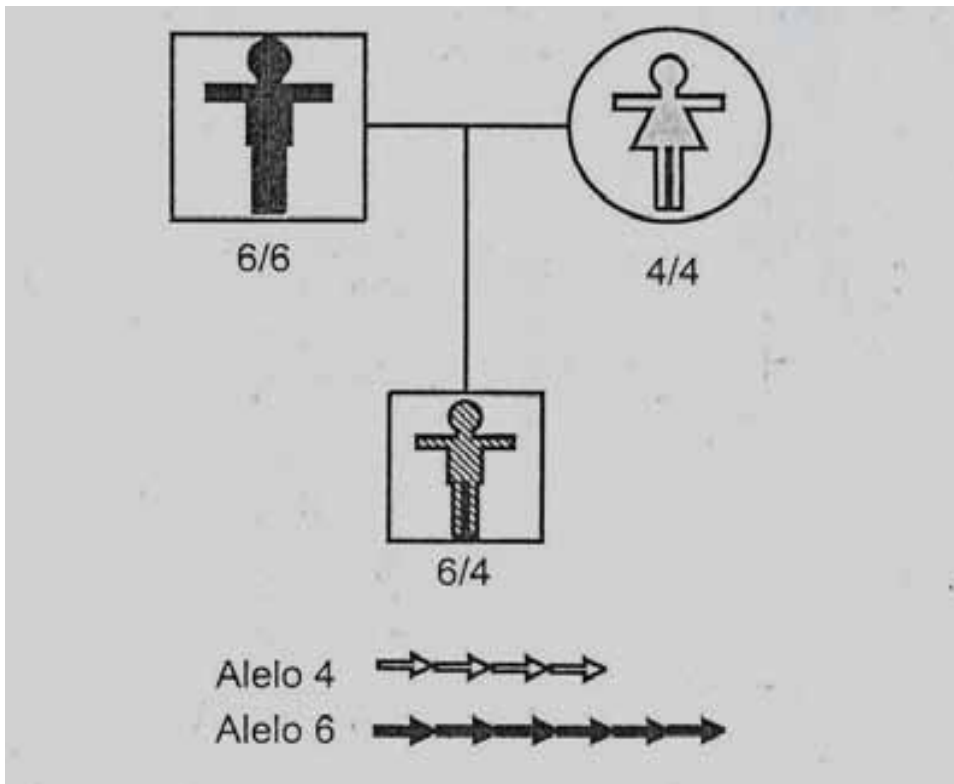


Figura 3.3. El individuo se identifica por el número de repeticiones AGT (→) que le heredaron sus padres.

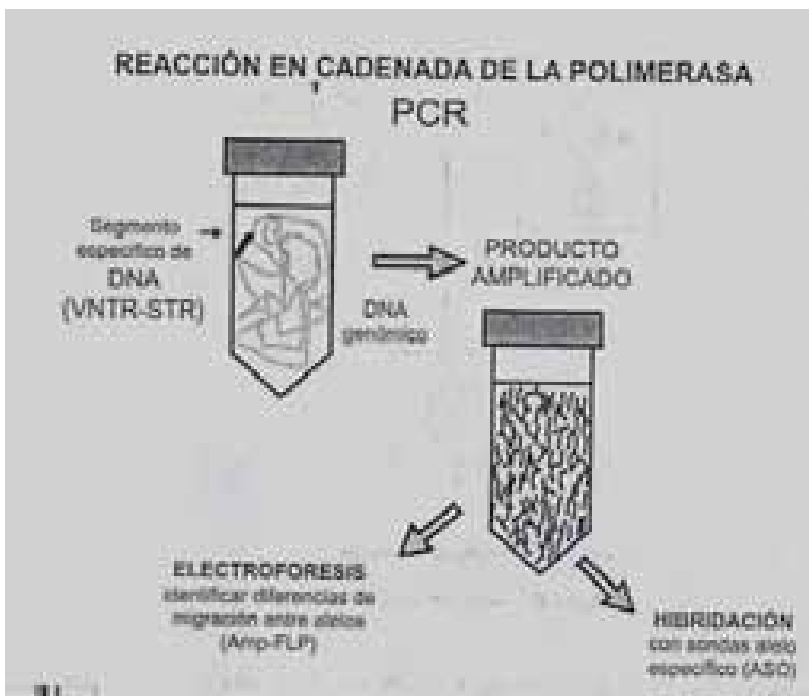


Figura 3.4. La amplificación facilita el análisis de un segmento específico o región de interés.

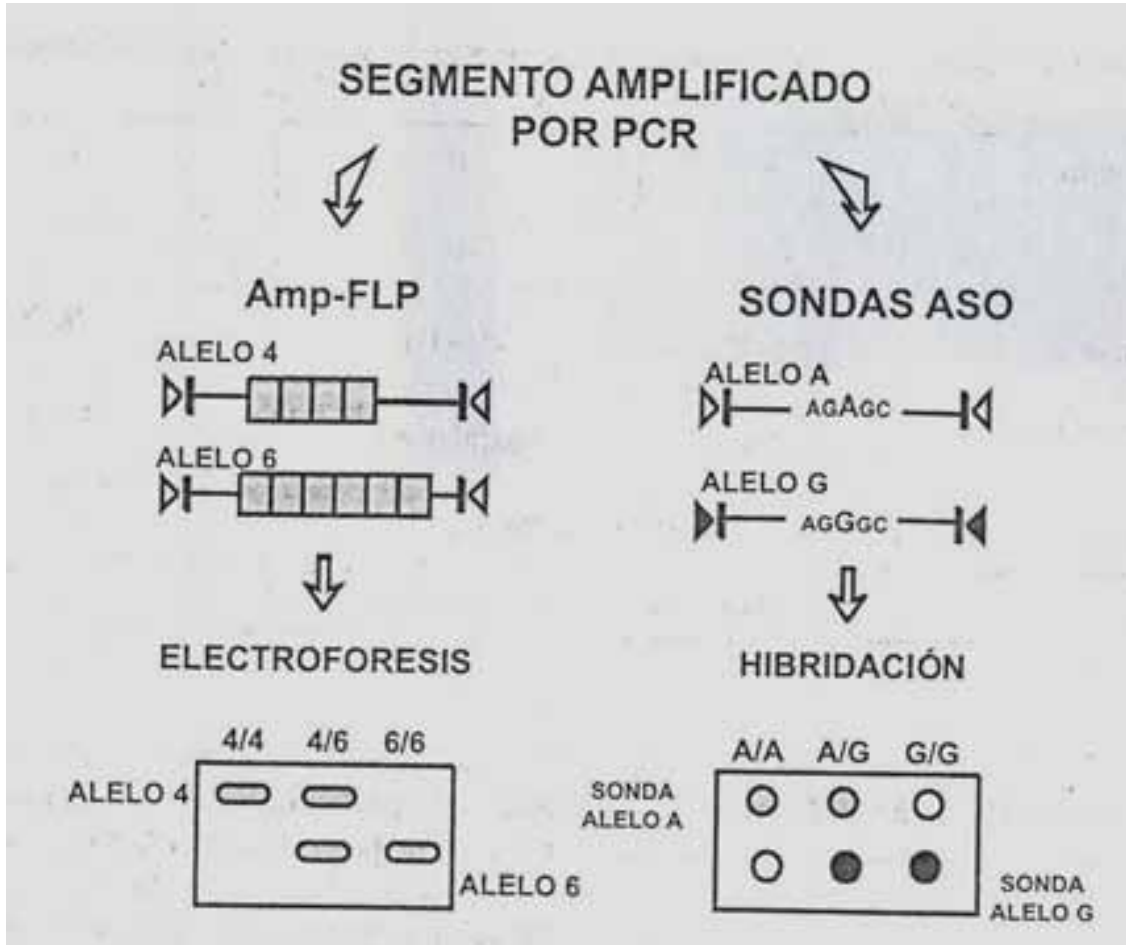


Figura 3.5. Análisis de polimorfismos a partir de productos amplificados por PCR. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (Amp-FLP) e hibridación con sondas alelo específico (Sondas ASO).

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
ESPECIALIDAD EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS FORENSES

■ **MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO PARA LA
IMPLEMENTACIÓN Y UTILIZACIÓN EN
UN LABORATORIO DE GENÉTICA
FORENSE.**

Identificación Genética y Pruebas de
Paternidad.

Autor: Bernardo Nicolás Torrico Arzady, M.Sc.

Trabajo de Grado para optar al Título de
Especialista

ADN
Mitocondrial



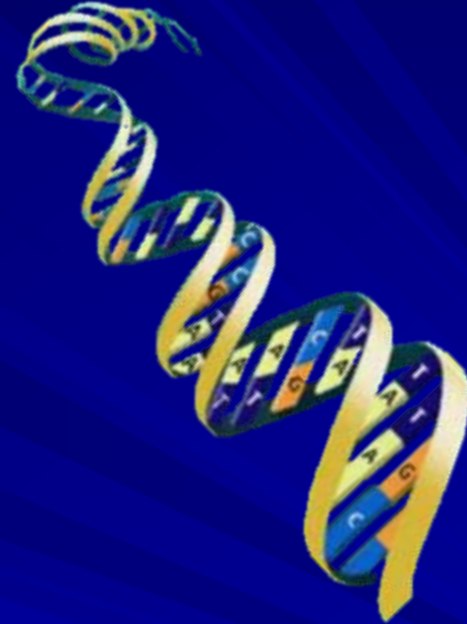
Núcleo

Mitocondria

Mitocondria



Núcleo



ADN Nuclear

Célula

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

■ I. SECCIÓN DIAGNÓSTICA

- Introducción a la necesidad de elaboración del Manual Teórico Práctico de Genética Forense.
- Objetivo Principal
- Objetivos específicos
- Resultados esperados
- Diseño de estudio, tipo de estudio

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

■ II. SECCIÓN PROSPECTIVA:

MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO PARA LA
IMPLEMENTACIÓN Y UTILIZACIÓN EN UN
LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE.

Identificación Genética y Pruebas de Paternidad.

Capítulo I. Introducción al estudio de la identidad genética.

Capítulo II. El laboratorio de Genética Forense.

Capítulo III. Marcadores Genéticos. Importancia
Antropológica y biomédica.

Capítulo IV. Estandarización de técnicas moleculares de
aplicación en genética forense.

Capítulo V. Aspectos poblacionales y Bioestadística de las
pruebas del DNA.

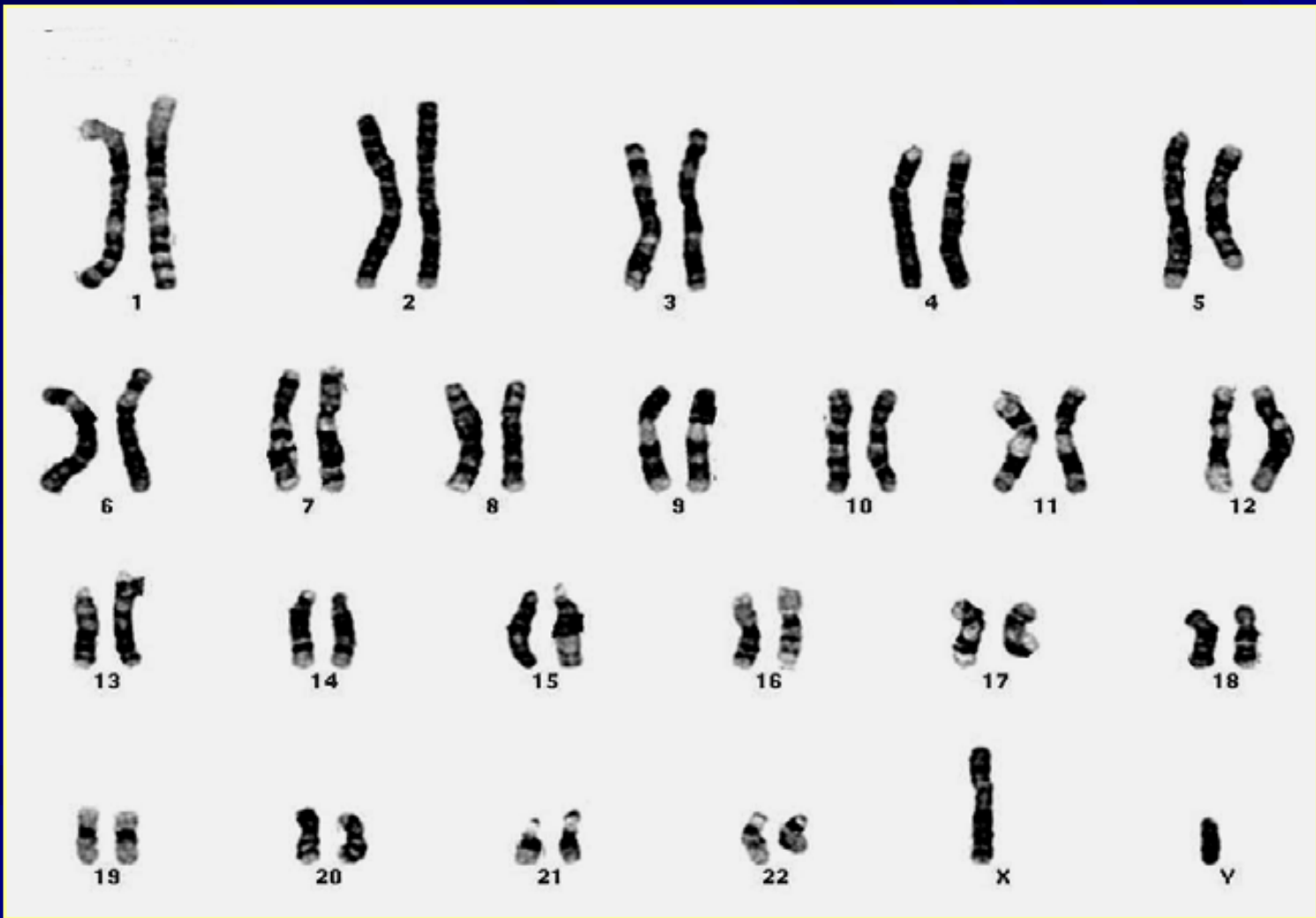
Capítulo VI. Consideraciones Finales

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

■ III. SECCIÓN CONCLUSIVA

- Ventajas y limitaciones de la genética forense.
- Pruebas genéticas:
 - Beneficios Clínicos
 - Beneficios Psicológicos Sociales
 - Beneficios para la salud públicaLimitaciones a las pruebas genéticas predictivas.
- Recomendaciones finales para la implementación de un laboratorio de genética forense en Bolivia.

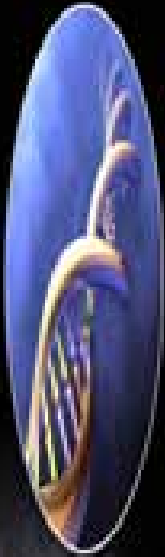
Cariotipo Humano



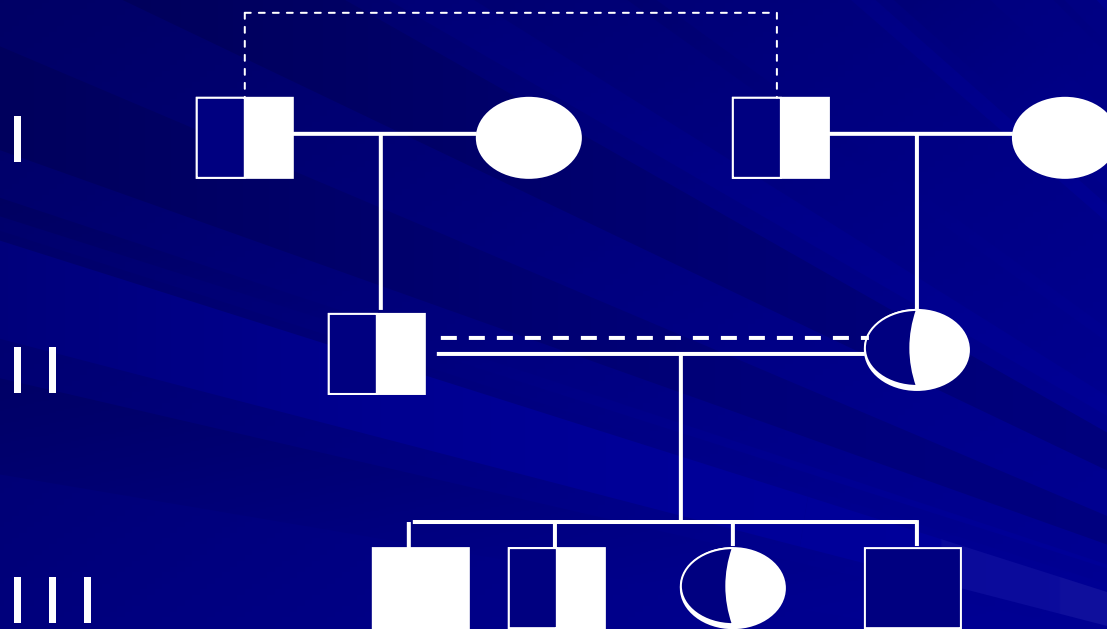
I. SECCIÓN DIAGNÓSTICA

1. Introducción a la necesidad de la elaboración del manual Teórico Práctico de Genética Forense:

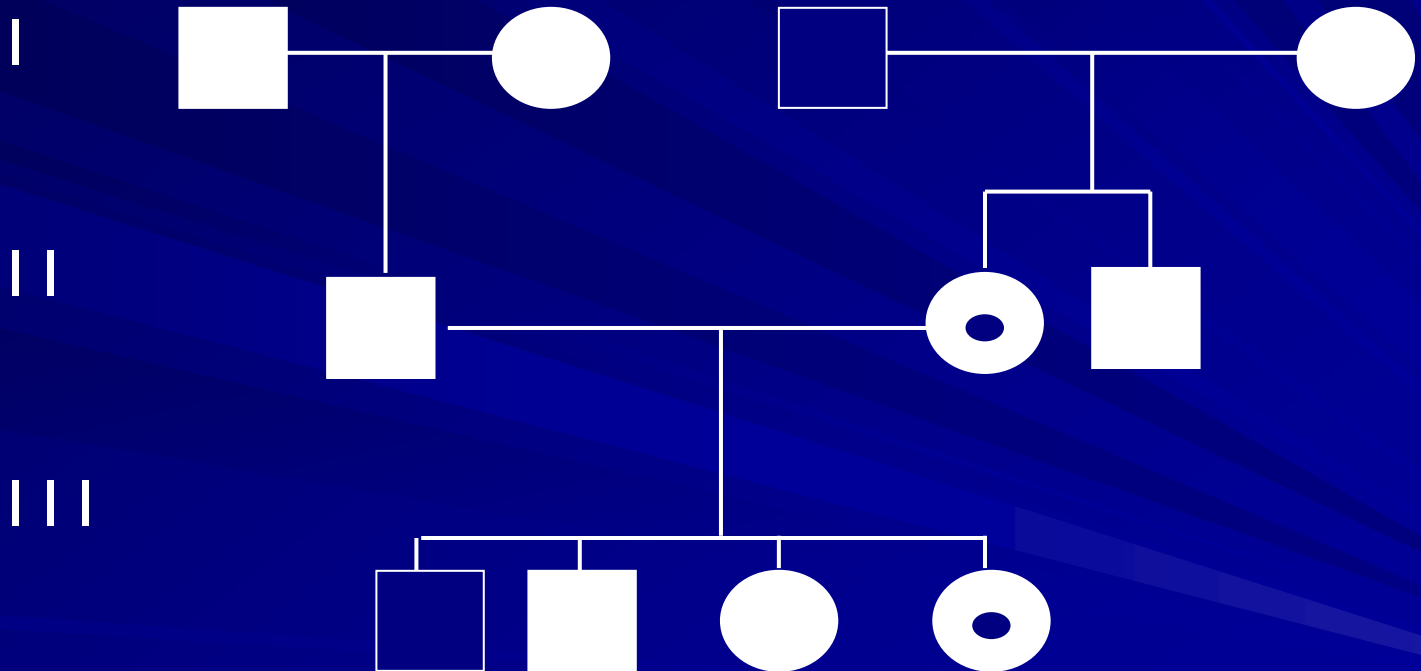
- Actualmente la investigación forense se respalda de la evidencia científica; es decir de los resultados obtenidos en un laboratorio.
- Los avances de la genética molecular permiten precisar la identidad biológica y el parentesco entre individuos de una misma especie, así como también adjudicar el origen de pequeñas muestras de tejido a un individuo en particular.
- A través del Manual, queremos poner al alcance de los profesionales y estudiantes dedicados al área de Genética Forense, los fundamentos genéticos de la individualidad humana y los métodos moleculares actualmente en uso. Experiencias recogidas durante el curso de especialidad y en la trayectoria personal del autor dedicada a la biología molecular, la ingeniería genética y biotecnología y a la citogenética humana.



Enfermedades Monogénicas Autosómicas



Enfermedades Monogénicas Ligadas al sexo



OBJETIVO PRINCIPAL

- Desarrollar y elaborar un manual teórico práctico para la implementación y utilización en un laboratorio de Genética Forense con los fundamentos genéticos de la individualidad humana y los métodos actuales en uso en el terreno de la identificación, la práctica forense y los casos de paternidad o parentesco dudoso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir en detalle los fundamentos genéticos y moleculares en la práctica de la genética forense.
- Estandarizar las distintas técnicas que se utilizan en laboratorio en problemas de identificación genética y las metodologías de análisis de los marcadores genéticos: desde la toma de muestra e indicios, purificación de ácidos nucleicos y técnicas moleculares para el estudio del DNA.
- Realizar y estandarizar diferentes técnicas para la extracción de DNA a partir de diferentes tejidos orgánicos.
- Evaluar la cantidad, integridad y calidad de las muestras aisladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar diferentes protocolos para la aplicación de la técnica de la PCR para amplificar secuencias altamente polimórficas del genoma humano, modalidad PCR multiplex.
- Describir otras técnicas moleculares de aplicación forense.
- Describir la organización del laboratorio de genética forense, sus postulados, las características de los peritos forenses, y los programas de garantía de la calidad.
- Desarrollar una acuciosa exposición de cómo deben interpretarse sus resultados, aplicando la bioestadística forense.
- Analizar los principios fundamentales de la genética de poblaciones, sus métodos estadísticos y su aplicación en la genética forense.

RESULTADOS ESPERADOS

- Qué el contenido del manual sintetice la experiencia teórico práctica adquirida en Genética Forense, durante el Curso de especialidad en Ciencias Bioquímicas Forenses de la UMSA, y que se constituya en un instrumento de consulta permanente en los laboratorios de Genética Forense, por los profesionales dedicados al área.

DISEÑO DEL ESTUDIO

- Tipo de Estudio: Experimental y Descriptivo.
- Experimental: estandarización de técnicas para la purificación de DNA a partir de muestras biológicas y de evidencias. Estandarización de técnicas para la amplificación del DNA a través de la PCR. Estandarización de técnicas para la determinación de la paternidad (amplificación de marcadores genéticos).
- Descriptivo: Elaboración del Manual de Genética Forense.

■ MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN Y UTILIZACIÓN EN UN LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE.

Identificación Genética y Pruebas de Paternidad.

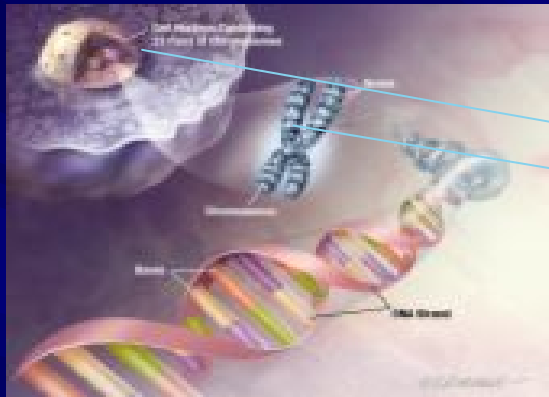
INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA IDENTIDAD GENÉTICA



GENOMA HUMANO

LOCALIZACION

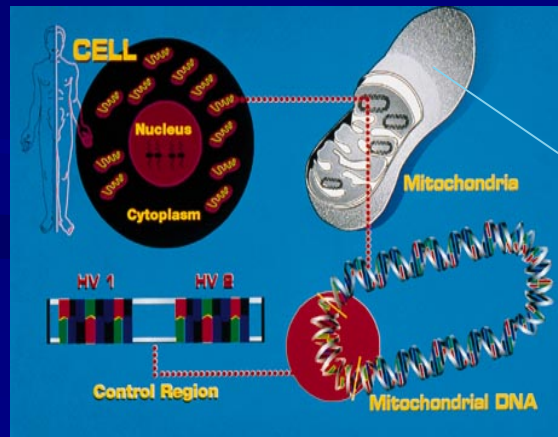
A) ADN NUCLEAR



LOCALIZACION:

- NUCLEO CELULAR
- CROMOSOMAS.
- CODIGO GENETICO UNIVERSAL

B) ADN MITOCONDRIAL



LOCALIZACION:

- MITOCONDRIA
- DIFERENTE CODIGO GENETICO

GENOMA HUMANO

FUNCION

A) ADN CODIFICADOR: 1,5%

GENES

B) ADN NO CODIFICADOR: 98,5%

INTRONES

SEC REGULADORAS

SEC PROMOTORAS

SEC EXTRAGENICAS



GENOMA HUMANO

ORGANIZACION

A) ADN COPIA UNICA → GENES

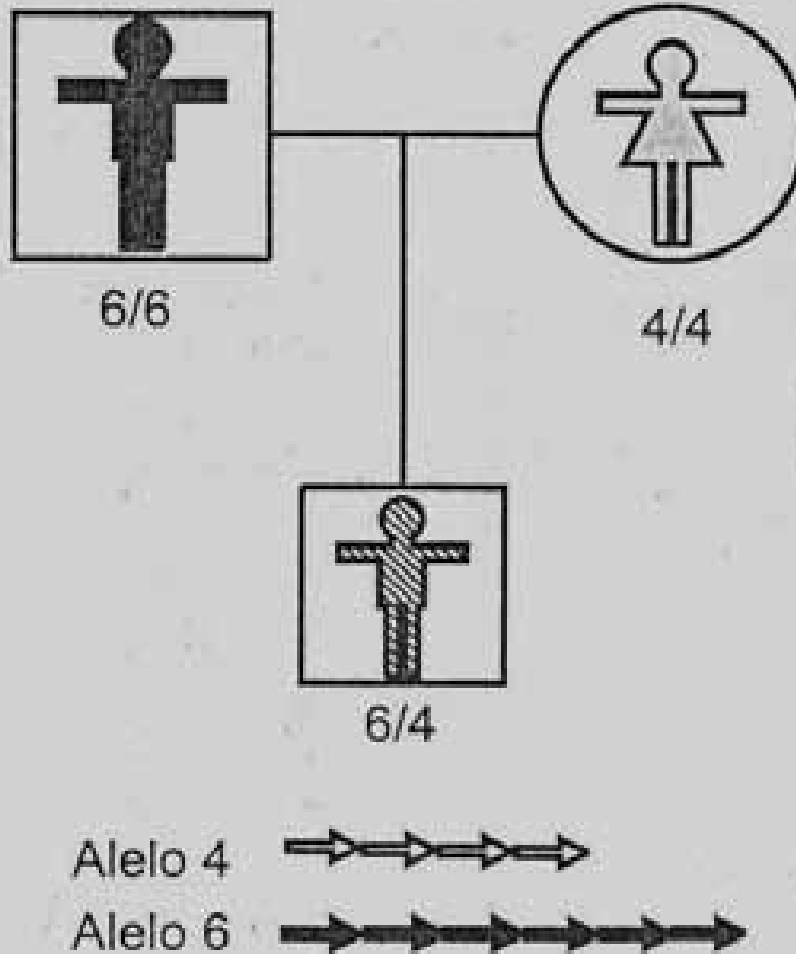
B) ADN COPIA REPETITIVA: → “ADN Basura”

1) DISPERSO

SEC. Alu
SEC. Kpn

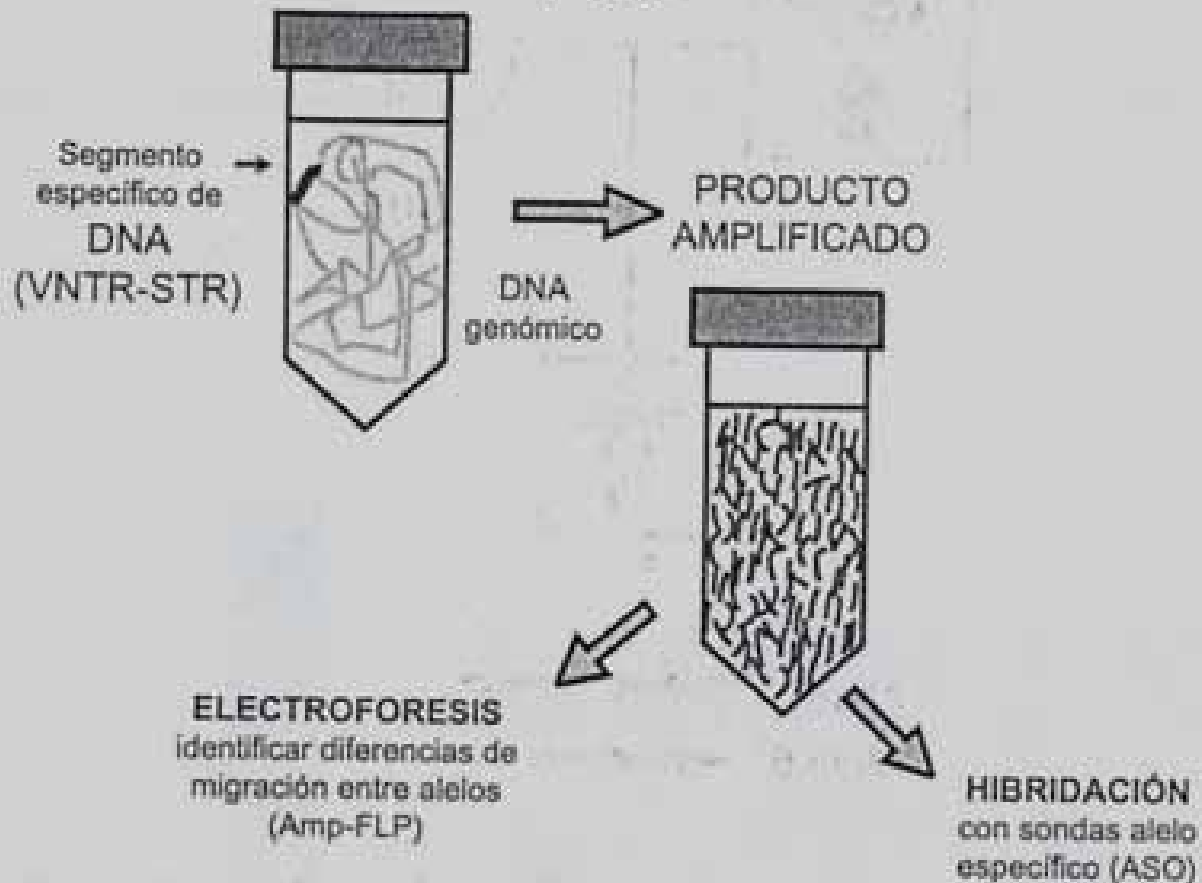
2) ADN SATELITE *

ALFA SATELITE
MINISATELITE (VNTRs)
MICROSATELITE (STRs)



El individuo se identifica por el número de repeticiones AGT (→) que le heredaron sus padres.

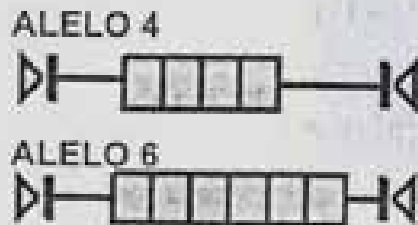
REACCIÓN EN CADENADA DE LA POLIMERASA PCR



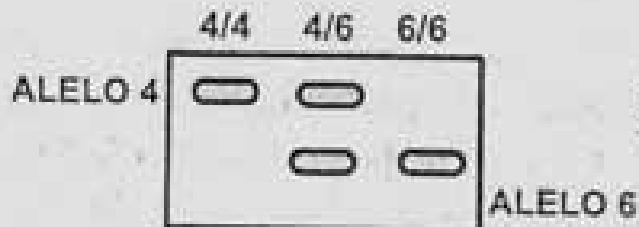
La amplificación facilita el análisis de un segmento específico o región de interés.

SEGMENTO AMPLIFICADO POR PCR

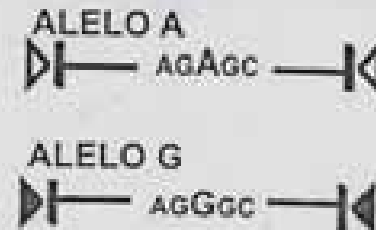
Amp-FLP



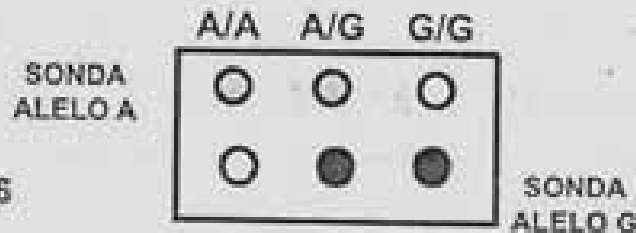
ELECTROFORESIS



SONDAS ASO



HIBRIDACIÓN

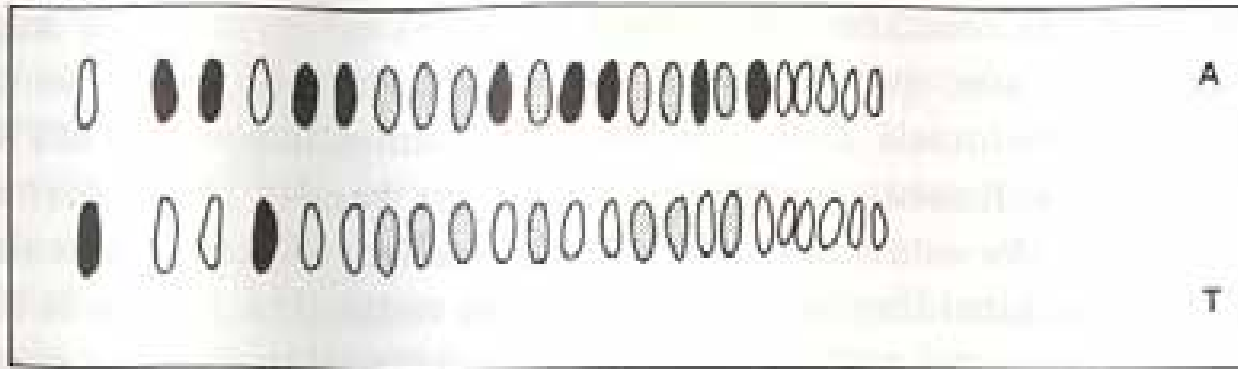


Análisis de polimorfismos a partir de productos amplificados por PCR. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (Amp-FLP) e hibridación con sondas alelo específico (Sondas ASO).

Utilización de otras sondas para la identificación específica de DNA

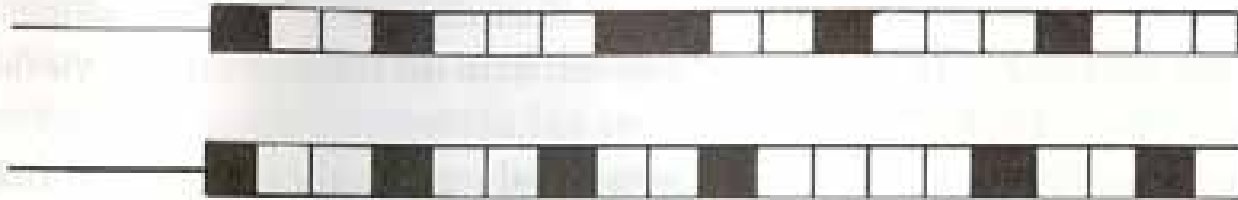
- La Sonda pAV 33.7
- Las Sondas 33.15 y 33.6: El patrón individual de bandas.
- La técnica MVR-PCR para el análisis de la movilidad genética.

FOTO



A

□ A
■ T



B

Resultados de MVR-PCR. (A). Electroforesis. (B) Distribución de Unidades A y T compatibles con la corrida de electroforesis.

ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO

ADN MINISATÉLITE (VNTR)

SECUENCIAS QUE SE REPITEN EN TÁNDEM HASTA ALCANZAR 10-15KB.

-- ATCG G ATCG G ATCG G ATCG G ATCG G ----

FUNCIÓN: MANTENER LA INTEGRIDAD CROMOSÓMICA

ADN NO CODIFICANTE: Especialmente útil para su aplicación en la identificación forense.

Gran variabilidad entre individuos.

ADN MICROSATÉLITE (STR)

SECUENCIAS REPETITIVAS DE 2-6 NUCLEÓTIDOS DISPERSAS POR TODO EL GENOMA, AUNQUE SOBRE TODO EN REGIONES NO CODIFICANTES

CSF1PO GenBank Sequence
(Accession X14720)

```

5' |----->
1  AACCTGAGTC  TGCCAAGGAC  TAGCAGGTTG  CTAACCACCC
   TTGGACTCAG  ACGGTTCTCTG  ATCGTCCAAC  GATTGGTGGG

41  TGTGTCTCAG  TTTTCCTACC  TGTA AAAATGA  AGATATTAAC
   ACACAGAGTC  AAAAGGATGG  ACATTTTACT  TCTATAATTG

81  AGTAACTGCC  TTCATAGATA  GAAGATAGAT  AGATTAGATA
   TCATTGACGG  AAGTATCTAT  CTTCTATCTA  TCTAATCTAT
   2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
121 GATAGATAGA TAGATAGATA GATAGATAGA TAGATAGATA
   CTATCTATCT ATCTATCTAT CTATCTATCT ATCTATCTAT
   12
161 GATAGGAAGT ACTTAGAACA GGGTCTGACA CAGGAAATGC
   CTATCCTTCA TGAATCTTGT CCCAGACTGT GTCCTTTACG

201 TGTCCAAGTG  TGCACCAGGA  GATAGTATCT  GAGAAGGCTC
   ACAGGTTTCA  ACGTGGTCCT  CTATCATAGA  CTCTTCCGAG

241 AGTCTGGCAC  CATGTGGGTT  GGGTGGGAAC  CTGGAGGCTG
   TCAGACCGTG  GTACACCCAA  CCCACCCTTG  GACCTCCGAC

281 GAGAATGGGC  TGAAGATGGC  CAGTGGTGTG  TGGAA
   CTCTTACCCG  ACTTCTACCG  GTCACCACAC  ACCTT
<-----|

```

REGIONES MICROSATELITES DEL GENOMA HUMANO

(Short Tandem Repeats).

- APLICACIONES EN GENETICA FORENSE:
- Por su abundancia y ser polimórficos se han convertido en uno de los marcadores de elección en el campo de la identificación genética, tanto del hombre como de otros organismos.
- Debido a su pequeño tamaño, se puede detectar y amplificar fragmentos de ADN degradados.
- En la actualidad se puede analizar cuatro sistemas simultáneamente (STR multiplex) en un solo tubo de reacción.
- Por estas razones nos da una probabilidad de matching (criterio de coincidencia) de más de 1 en cien mil millones.

¿Qué hace a los (STR) SHORT TANDEM REPEATS buenos marcadores?

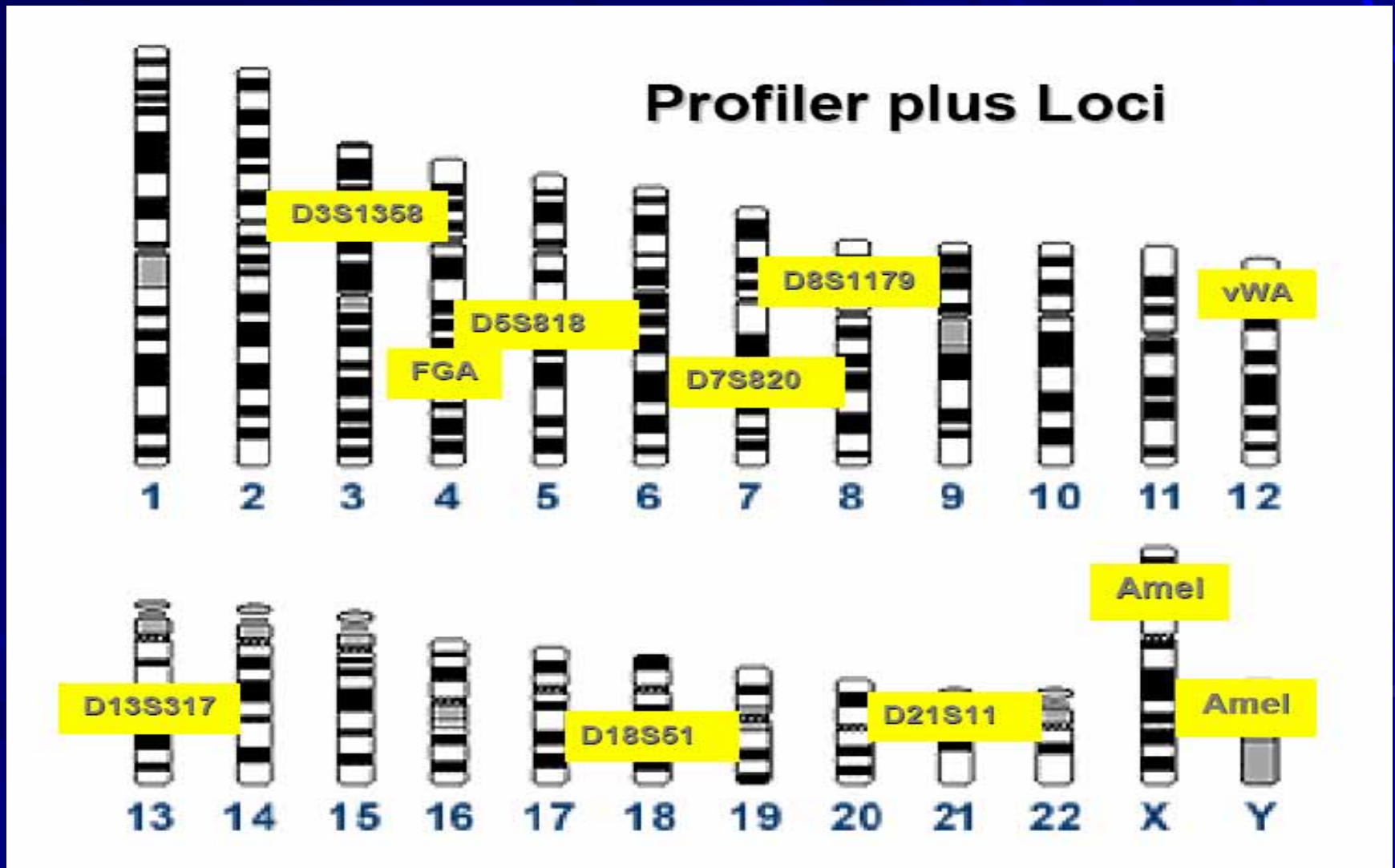
Secuencias repetitivas en todos los Cromosomas humanos.

- **Alto grado de variabilidad genética.**
- **Fragmentos cortos de DNA de 120 – 400 bp**
- **Pueden ser combinados varios locis en un solo test.**

Multiplex PCR (Profiler Kit)

• D3S1358	3p	114-142 bp	8 alleles	(TCTA)
• VWA	12p	157-197 bp	11 alleles	(TCTA)
• FGA	4q	219-267 bp	14 alleles	(CTTT)
• Amelogenin	Xp, Yp	107, 113 bp		
• THO1	11p	169-189 bp	7 alleles	(AATG)
• TPOX	2p	218-242 bp	8 alleles	(AATG)
• CSF1PO	5q33	281-317 bp	10 alleles	(AGAT)
• D5S818	5q21	135-171 bp	10 alleles	(AGAT)
• D13S317	13q	206-234 bp	8 alleles	(GATA)
• D7S820	7q	258-294 bp	10 alleles	(GATA)

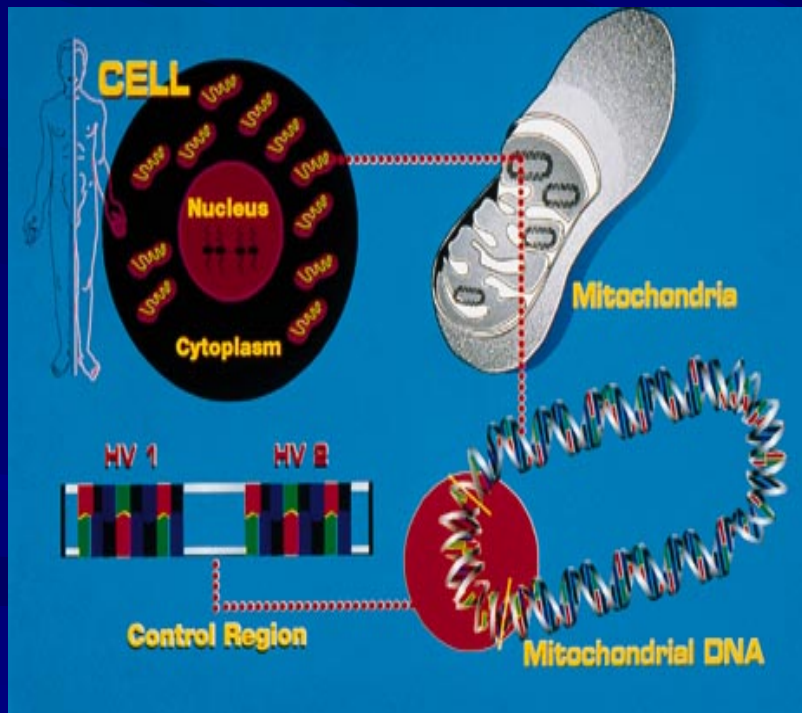
UBICACIÓN DE LOS MARCADORES STR DE USO FORENSE EN LOS CROMOSOMAS HUMANOS



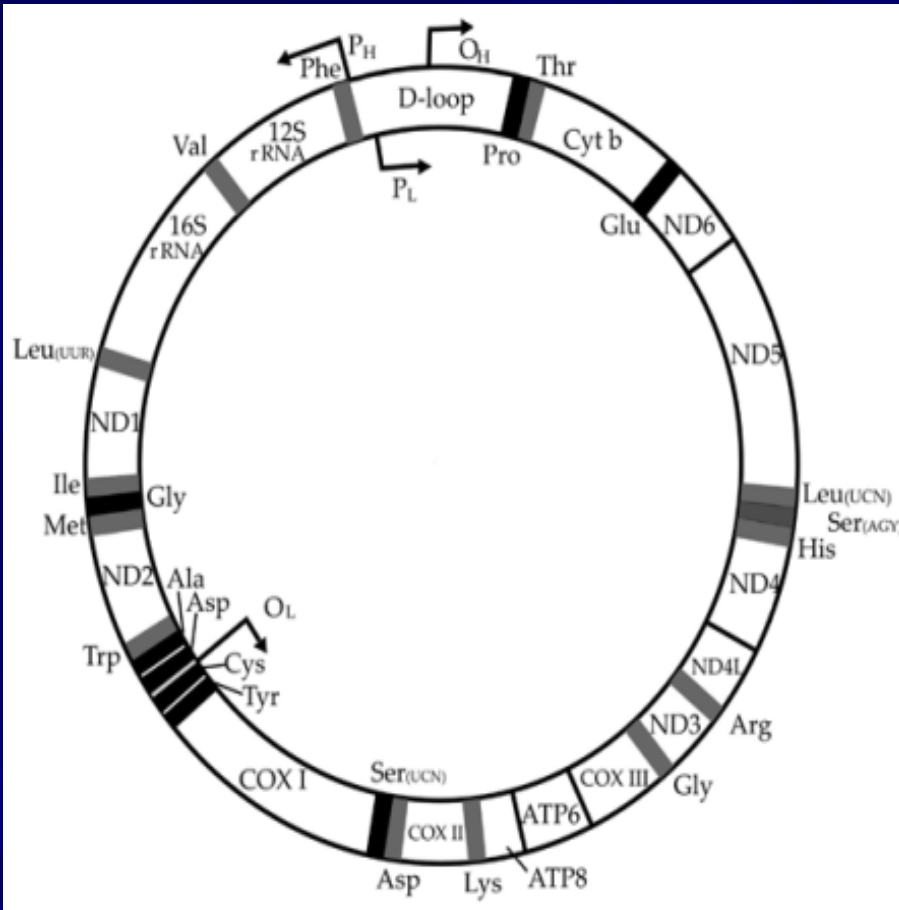
ADN MITOCONDRIAL

LONGITUD DE UNOS 16KB, CIRCULAR, CON POCAS SECUENCIAS REPETITIVAS

SE ANALIZAN DOS REGIONES HIPERVARIABLES



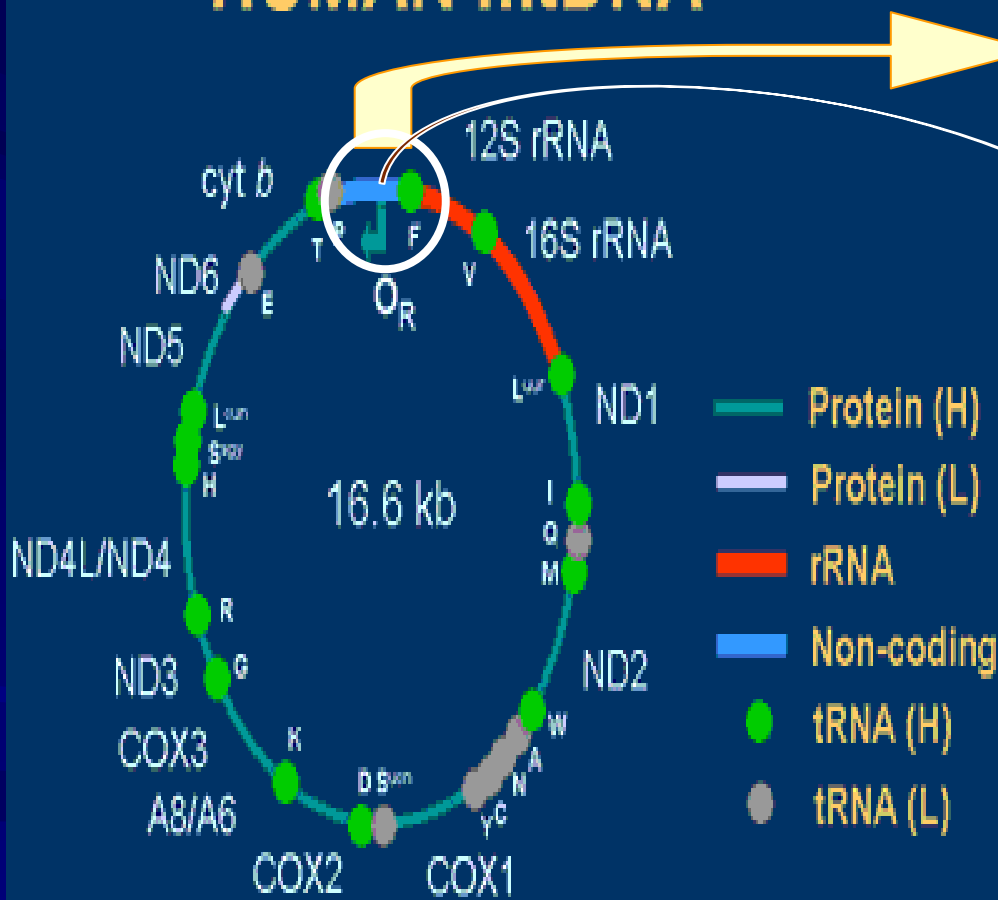
ADN MITOCONDRIAL (ADN mt)



- Molécula circular de 16.569 pb.
- Dos cadenas de ADN complementarias.
- Codificación de 37 genes.
- Pérdida de la universalidad del código genético.
- Alto índice de mutación.

ADN MITOCONDRIAL (Estructura)

HUMAN mtDNA



Región exenta de genes
(D-LOOP) o asa **D**
(7% ADNmt)

1. REGIÓN HIPERVARIABLE I
16,024 → 16,365
2. REGIÓN HIPERVARIABLE II
73 → 340

ÁREA POLIMÓRFICA POR EXCELENCIA
DEL GENOMA MITOCONDRIAL.

**UTILIDAD PARA PROPÓSITOS
FORENSES.**

APLICACIONES DEL ANALISIS DE ADN MITOCONDRIAL.

a) Vinculación de individuos desaparecidos con grupos familiares.

b) Estudios poblacionales.

- *Migración de grupos humanos.*

- *Antropología molecular.*

- *ADN Antiguo.*

ADN nuclear escaso o degradado.

Muestra representativa: Cabello con bulbo, huesos, dientes.

MARCADORES DE LINAJE SISTEMAS HAPLOIDES

MATRILINEAL
Genoma Mitocondrial



A
N
D
E
R
S
O
N

A
A
G
C
A
T
T
T



A
A
G
G
T
T
T



A
A
G
G
A
G
T



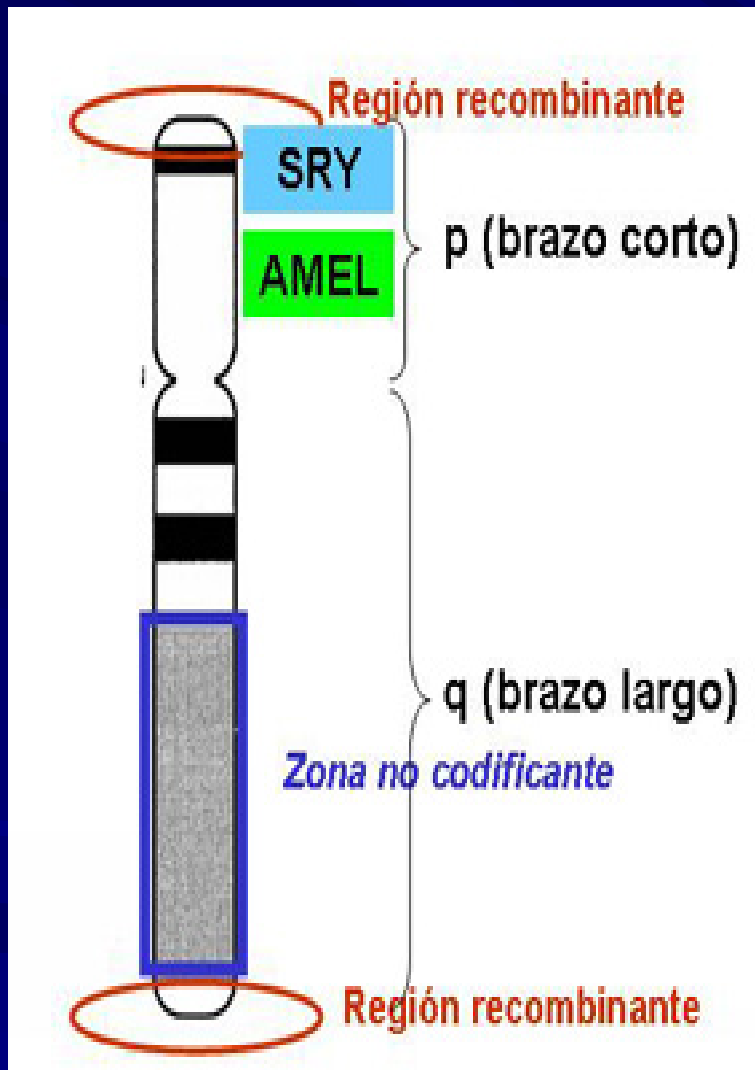
A
A
T
C
A
T
T
T



A
A
T
C
A
T
T
T

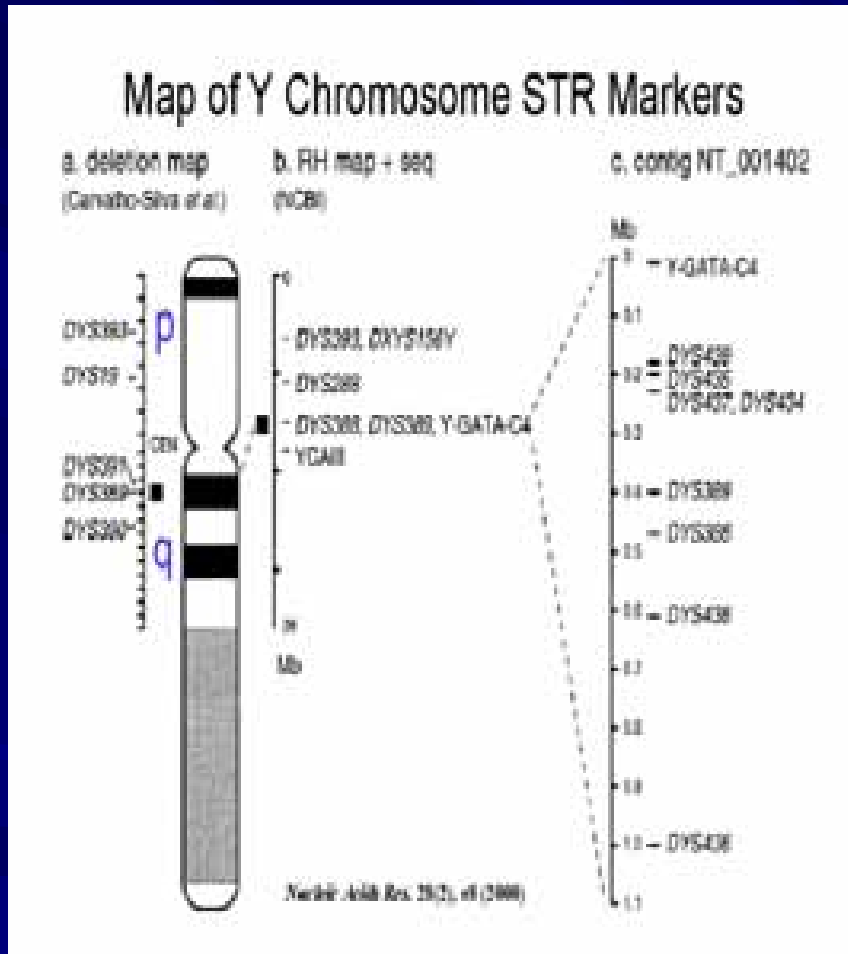


CROMOSOMA Y



- En la especie humana (Determinación del sexo). Cromosomas sexuales presentes en las células (cromosomas X e Y).
- Así, el sexo Femenino X (XX). Masculino X y Y (XY).
- Regiones situadas en los extremos => grado de recombinación con el cromosoma X.
- El cromosoma Y se transmite como una unidad íntegra de padres a hijos varones.

CROMOSOMA Y



- Igual que el ADN mitocondrial para las mujeres, pueda seguirse una determinada variante o haplotipo en sucesivas generaciones.
- El Cromosoma Y se analiza de forma rutinaria en el campo de la Genética de Poblaciones y la Genética Forense.

Mapa de Marcadores del Cromosoma Y

PAR1 C

11.2
DYS199
DYS271

DYS287

11.21

11.23

12

PAR2 C



DYS393
DYS19
DYS199

Sec α alfoides

DYS391
DYS388
DYS389
Y-GATA

DYS390

DYS385
DYS392

Y-GATA-C4

DYS439
DYS435
DYS437, DYS434

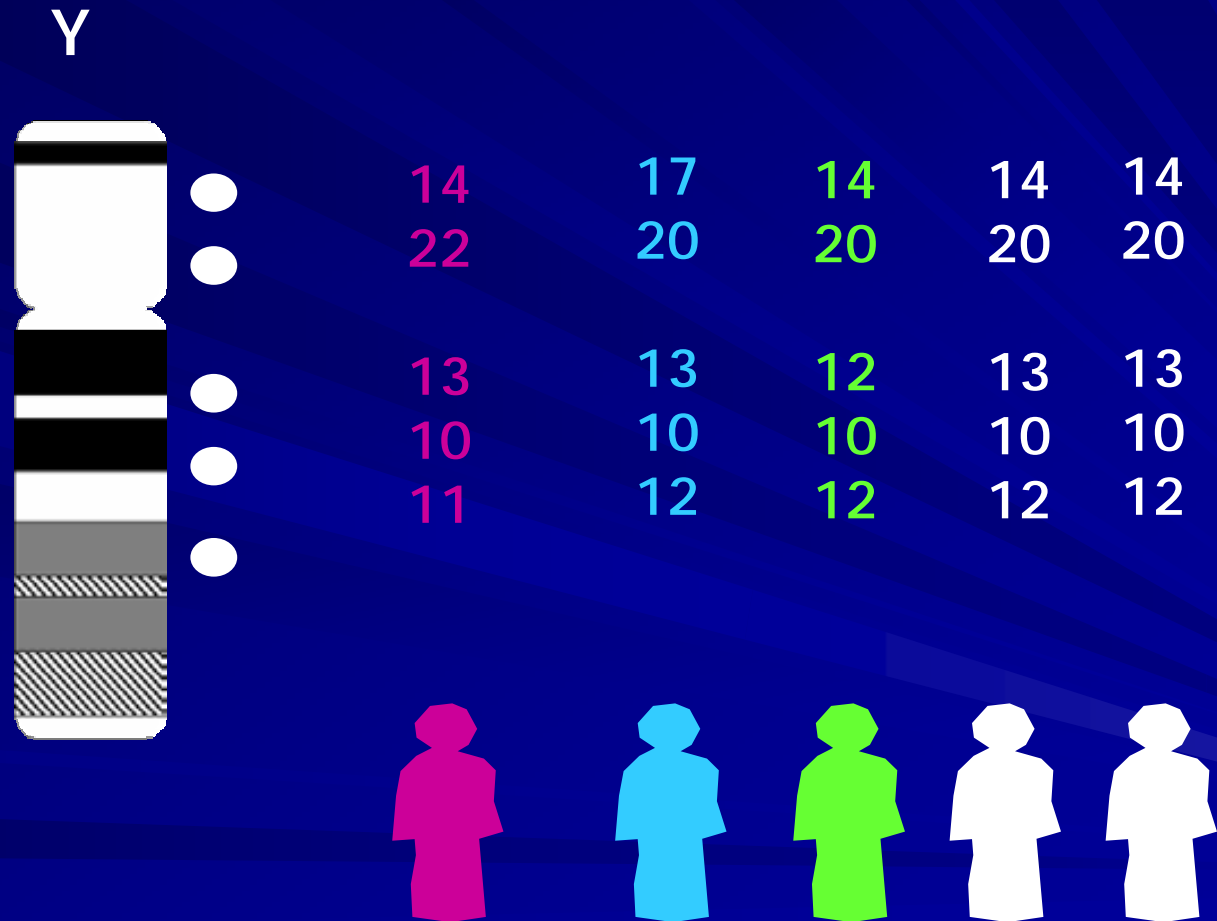
DYS438

DYS436

GENOMA PATRI LINEAL

Genoma Cromosoma Y

Y-STRs



Marcadores del Cromosoma Y

Polimorfismos Y-STRs

SISTEMA	U.R.	RANGO pb	Nro. REPET.	ALELOS
DYS19	[GATA]n	174-210	10-19	10
DYS385	[GA-A]n	353-405	1-13	13
DYS389I	[CTAT]n	239-263	7-13	7
DYS389II	[CTAT/CTGT]n	353-385	23-31	9
DYS390	[CTAT]n	195-227	5-14	10
DYS391	[CTAT]n	275-291	8-13	6
DYS392	[ATT]n	236-263	7-16	8
DYS393	[GATA]n	116-132	11-15	5

APLICACIONES DE LA PRUEBA DE ADN EN IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS:

- **Paternidad, Maternidad, Hermandad, otros vínculos biológicos.**
- **Agresiones Sexuales: Violaciones, Homicidios.**
- **Desaparecidos, Siniestros, Desastres en masa, Conflictos Bélicos, Desastres Naturales.**

PRUEBA DE PATERNIDAD

- La Prueba de Paternidad es una prueba de ADN que determina si un hombre pudiera ser el padre biológico de un niño.
- Todos heredamos nuestro ADN (el material genético) de nuestros padres biológicos.
- Una prueba de paternidad compara el patrón de ADN de un niño con el del presunto padre para analizar la evidencia de esta herencia – la prueba más definitiva de una relación biológica.

PRUEBA DE PATERNIDAD

- El resultado de una prueba de paternidad es o una exclusión (el presunto padre no es el padre biológico), o una inclusión (el presunto padre es considerado el padre biológico).
- Para una prueba estándar de paternidad, se debe garantizar al menos un 99.99% de probabilidad de paternidad en el caso de inclusiones o 100% de certeza de exclusión.
- Paternidad y Cadena de Custodia : Asegurar de que se obtengan resultados precisos y legalmente admisibles.

PRUEBA DE PATERNIDAD

- Partes intervinientes en la Prueba
- En una prueba de paternidad estándar, los participantes a ser examinados incluyen:
 - Un niño.
 - El presunto padre
 - La madre (llamado un trío).
- La participación de la madre en la prueba de paternidad ayuda a excluir la mitad del ADN del niño, dejando la otra mitad para comparación con el ADN del presunto padre.

PRUEBA DE PATERNIDAD

- Sin embargo, se puede realizar una prueba de paternidad sin la participación de la madre (denominada “con madre ausente”), la cual requiere análisis adicionales.
- Los resultados son igualmente concluyentes sea que haya o no la participación de la madre. Las pruebas con madre ausente tienen garantizado al menos un 99.9% de probabilidad de paternidad para las inclusiones y 100% por exclusión.




PRUEBA DE PATERNIDAD



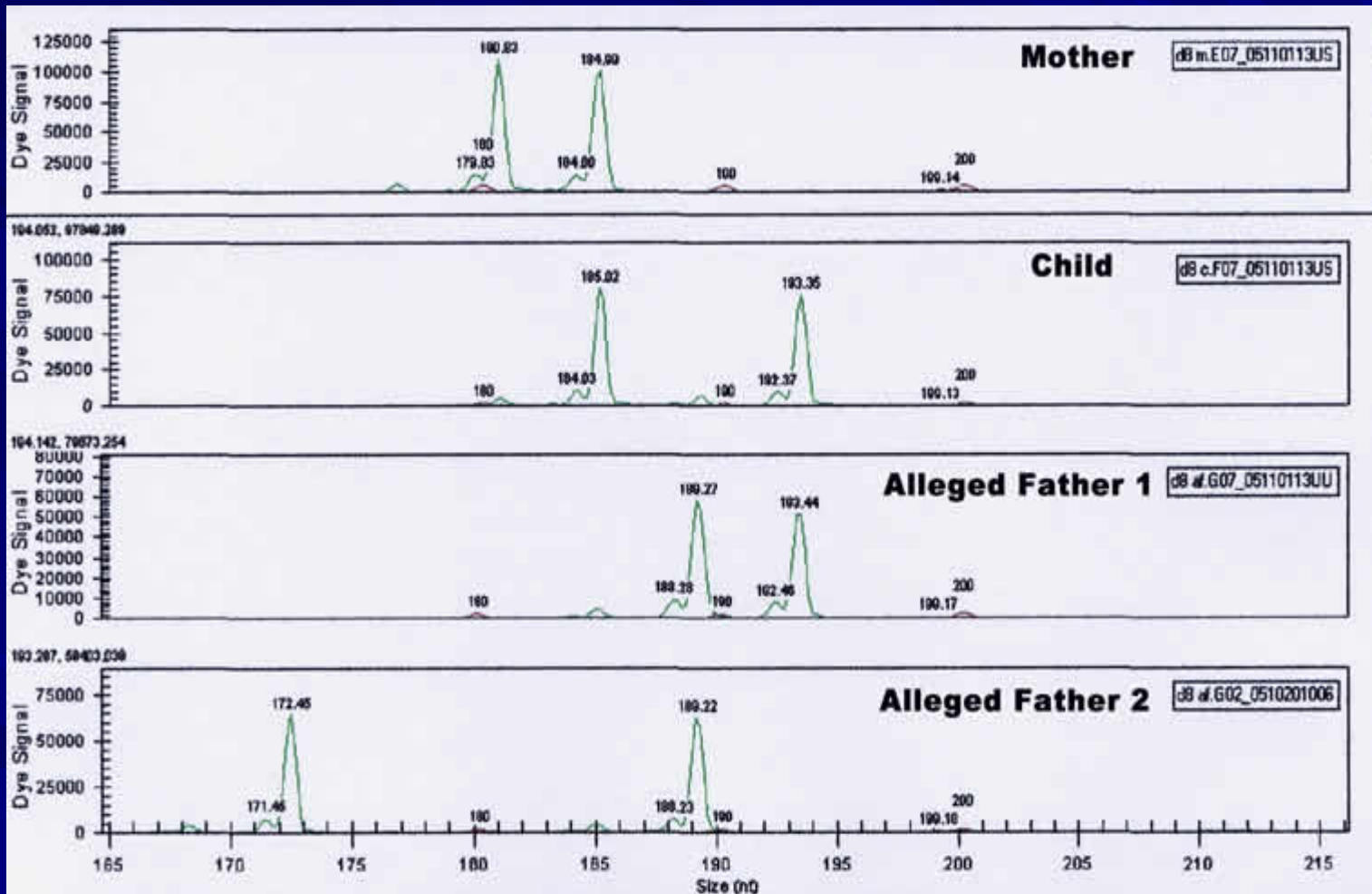
Paternity Not Excluded

Mother's DNA Profile	Child's DNA Profile	Alleged Father's Profile
		

Paternity is Excluded

Mother's DNA Profile	Child's DNA Profile	Alleged Father's Profile
		

RESULTADO DE UNA PRUEBA DE PATERNIDAD (Automatizado)



INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Pruebas de Paternidad

IP

Expresa cuantas veces es mas probable que el padre alegado sea el padre biológico contra una sola probabilidad de que no lo sea.

W

Probabilidad de Paternidad (%)
($> 99,9999\%$)

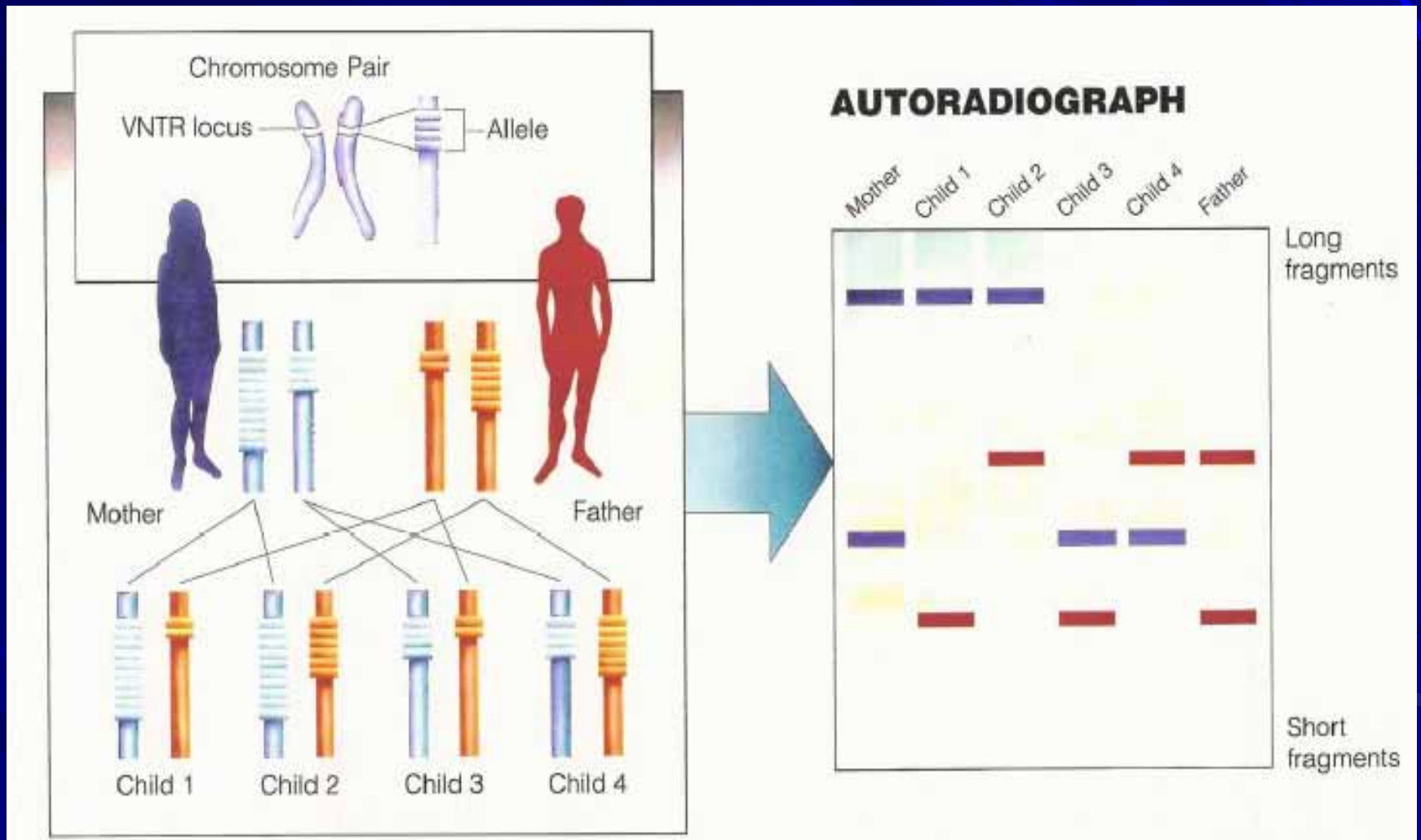
■ RESULTADOS POSIBLES: Inclusión o Exclusión.

PREDICADOS DE HUMMEL

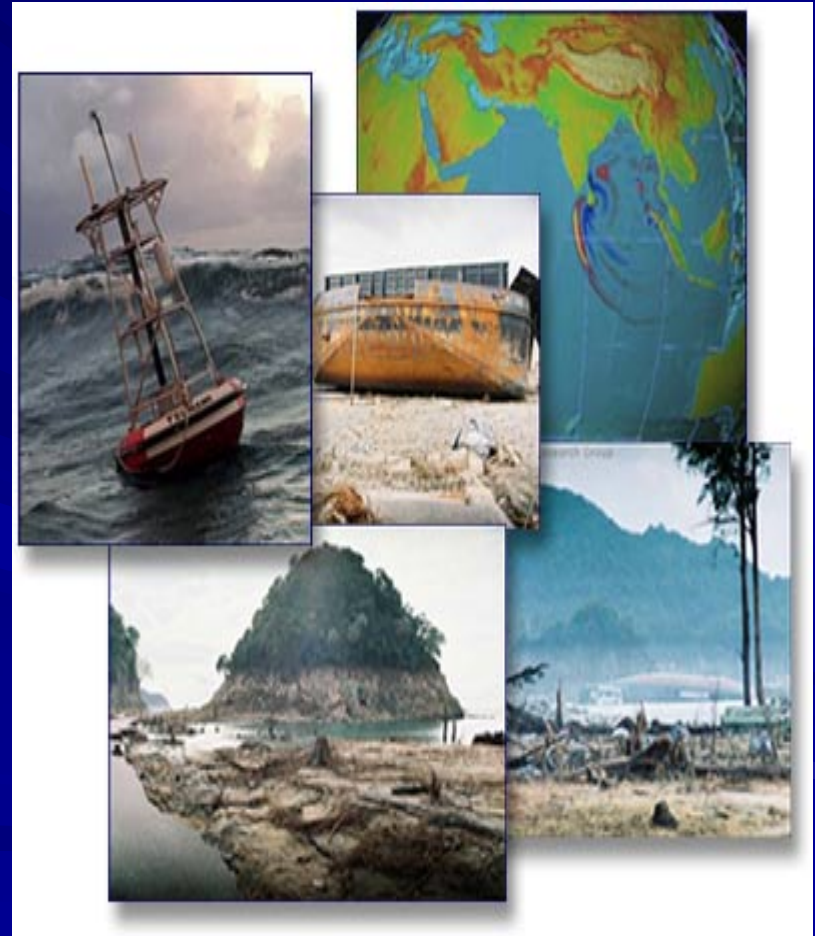
Pruebas de Paternidad

$W \geq 99.73\%$	Paternidad prácticamente probable
$W \geq 99\% < 99.73\%$	Paternidad extremadamente probable
$W \geq 95\% < 99\%$	Paternidad muy probable
$W \geq 90\% < 95\%$	Paternidad probable
$W \geq 50\% < 90\%$	Paternidad mas probable que no paternidad

COMO OBTENER UN PERFIL INDIVIDUAL



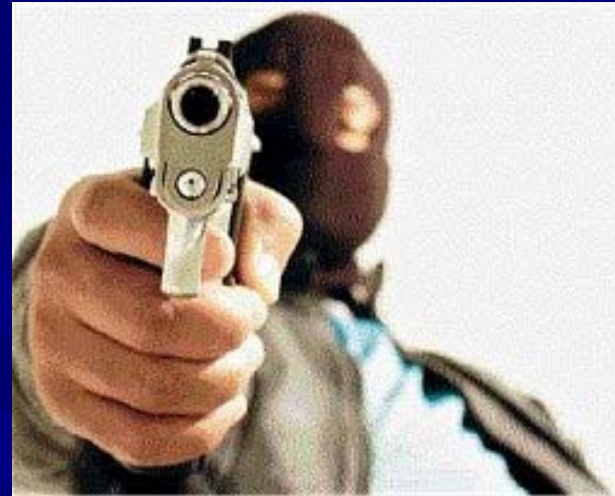
Desastres en masa, desastres naturales, accidentes aéreos



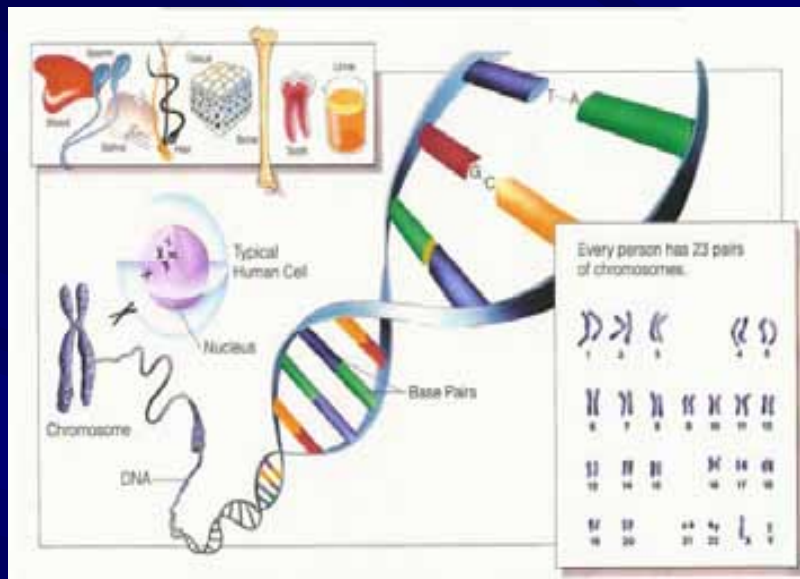
Desaparecidos, Siniestros, Dx postmortem



Violaciones, Homicidios



FUENTES DE OBTENCION DE ADN.



- SANGRE.
- MEDULA OSEA.
- PIEL.
- TEJIDOS CONGELADOS.
- PULPA DENTAL.
- TEJIDOS CULTIVADOS.
- PELOS CON O SIN BULBO.
- UÑAS, CUTICULA.
- ORINA, HECES.

- HISOPADO BUCAL, SALIVA.
- HISOPADOS VAGINALES, RECTALES.
- LIQUIDO AMNIOTICO.
- SEMEN.
- RESTOS OSEOS.
- RESTOS CALCINADOS.
- RESTOS MOMIFICADOS.
- BIOPSIAS
- TUMORES.

OBJETOS COMUNES Y EVIDENCIAS FISICAS DONDE SE PUEDE HALLAR ADN

- COSMETICOS.
- MAQUINAS DE AFEITAR.
- PROTESIS DENTARIAS.
- ARMAS DIVERSAS.
- ANILLOS, RELOJES.
- ROPAS DIVERSAS.
- SUPERFIES DIVERSAS.
- JERINGAS.
- PEINES Y CEPILLOS.
- TAZAS, VASOS, CUBIERTOS.
- FILTROS Y COLILLAS DE CIGARRILLOS.
- SOBRES, ESTAMPILLAS.
- MEDIAS, CALZADOS.
- ALIMENTOS.

RECOGIDA Y MANEJO DE MUESTRAS PARA EL ANALISIS DE ADN

■ PERSONAL ENTRENADO:

Conocimientos técnicos y experiencia adecuada en la recogida de muestras.

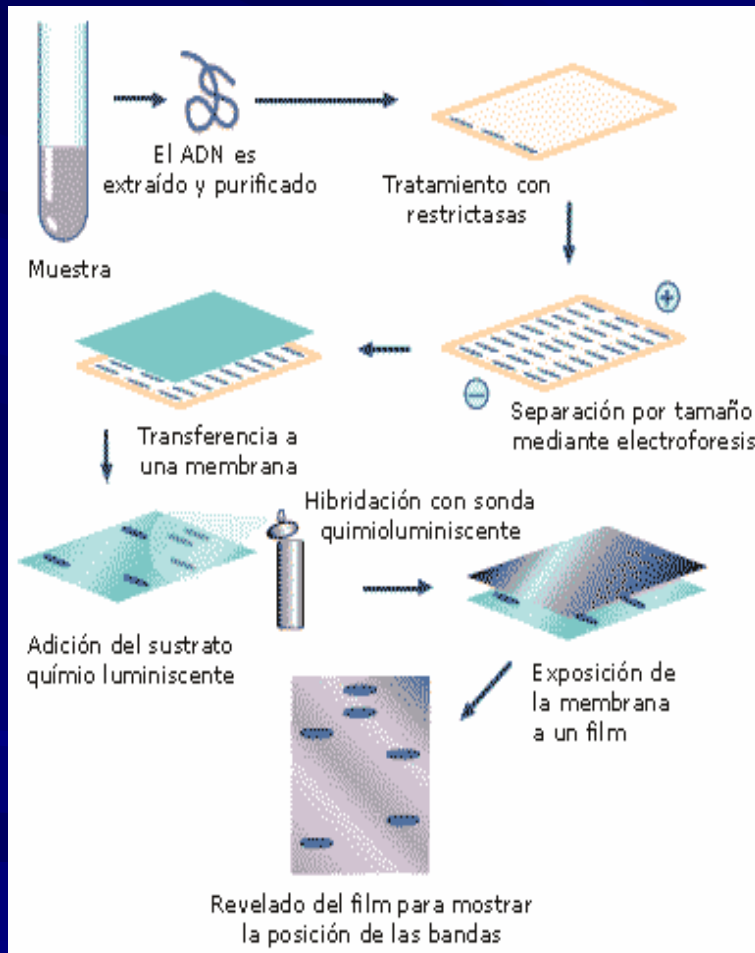
■ TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS.

- Protección personal.
- Protección de la muestra o indicio.
- Identificación de la Muestra, Caso y víctima.
- Cadena de custodia.

■ **ESTRATEGIAS METODOLOGICAS ANALISIS DE ADN.**

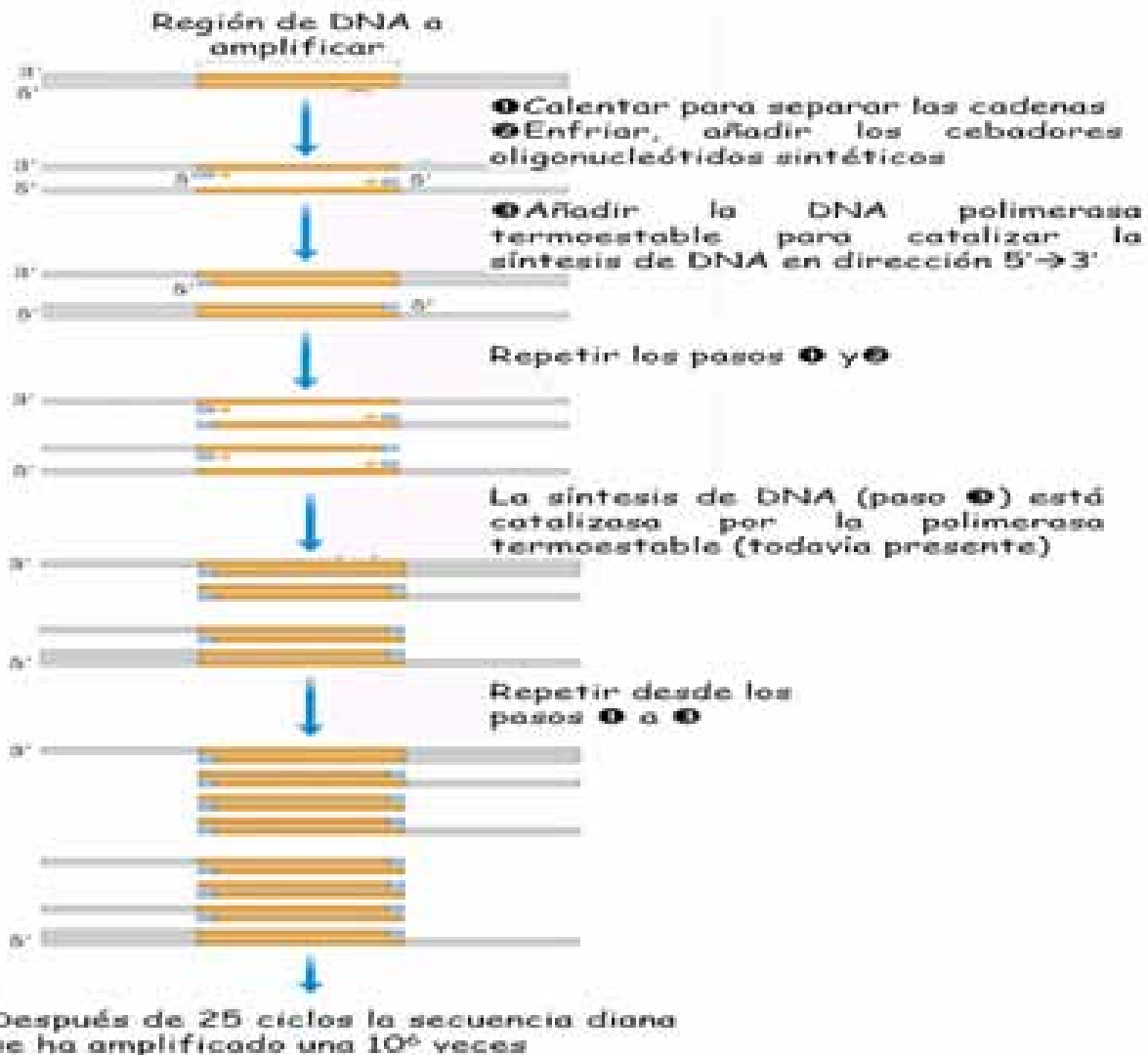
- **Marcadores Genéticos.**
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**
- **Sistemas Manuales y Automatizados.**
- **Bases de Datos .**

TECNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE DNA



1. Muestra.
2. Métodos de extracción y purificación de ADN.
3. Análisis Molecular.
 - Secuenciación.
 - Hibridación con sondas.
 - PCR
4. Enzimas de Restricción.
5. Electroforesis.
6. Tinción de placas.
7. Revelado.
8. Observación.
9. Análisis Estadístico.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

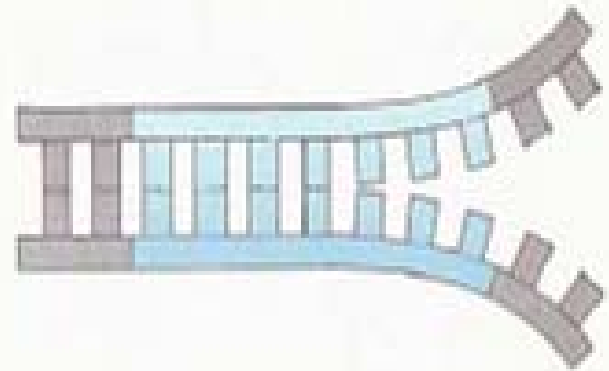


PCR: Tres fases:

■ **DESNATURALIZACIÓN:**

El ADN molde se encuentra en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas.

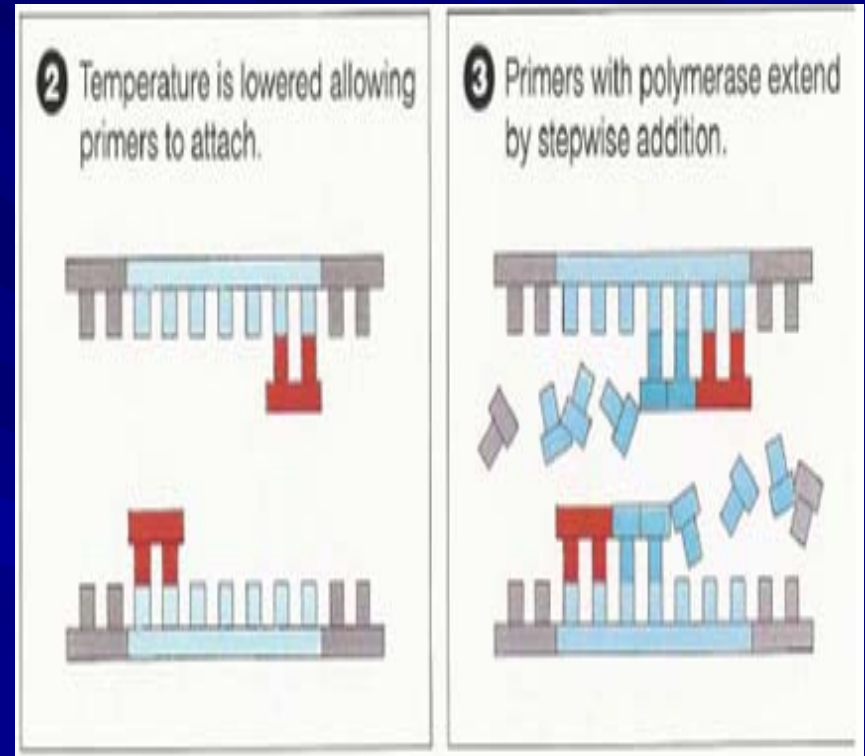
1 Double-stranded DNA is split into single strands at high temperature.



PCR

■ **HIBRIDACIÓN:**

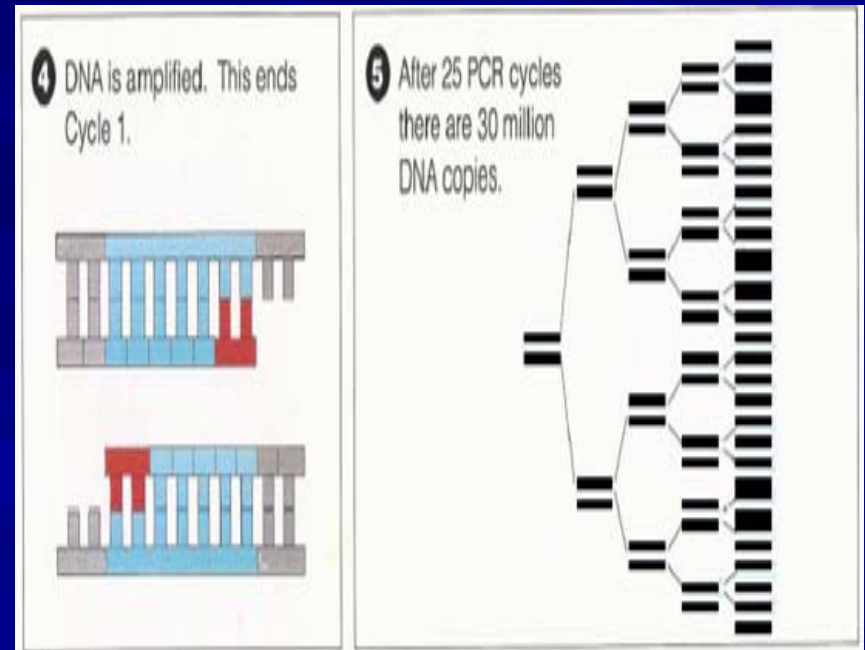
Fase de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.



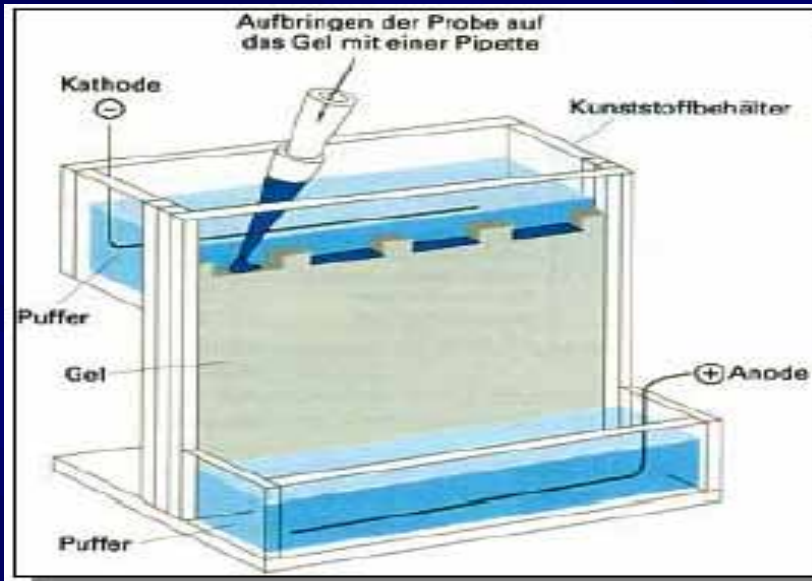
PCR

- **EXTENSIÓN:** Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada.

La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos.



TECNICAS DE ANALISIS DE DNA



EQUIPO DE ELECTROFORESIS.

- Polimerizado de Gel de Poliacrilamida.
- Análisis de ADN por Electroforesis.



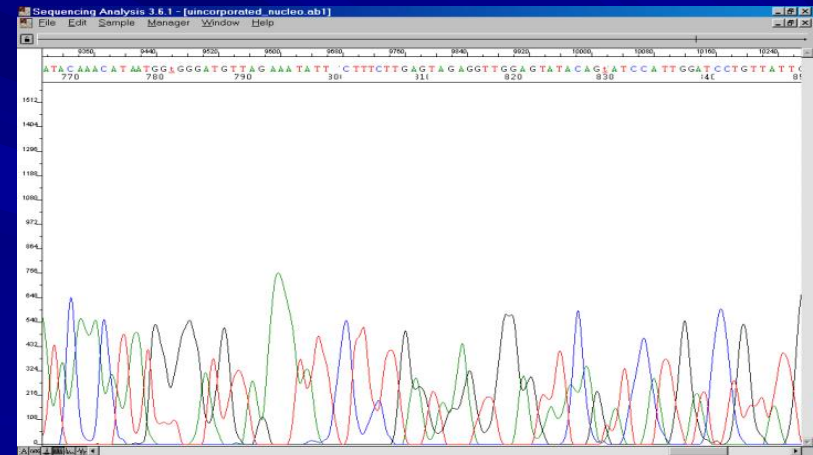
GEL DE CORRIDA ELECTROFORETICA.

- Determinación de Fragmentos de ADN.
- Análisis: STRs, VNTRs.

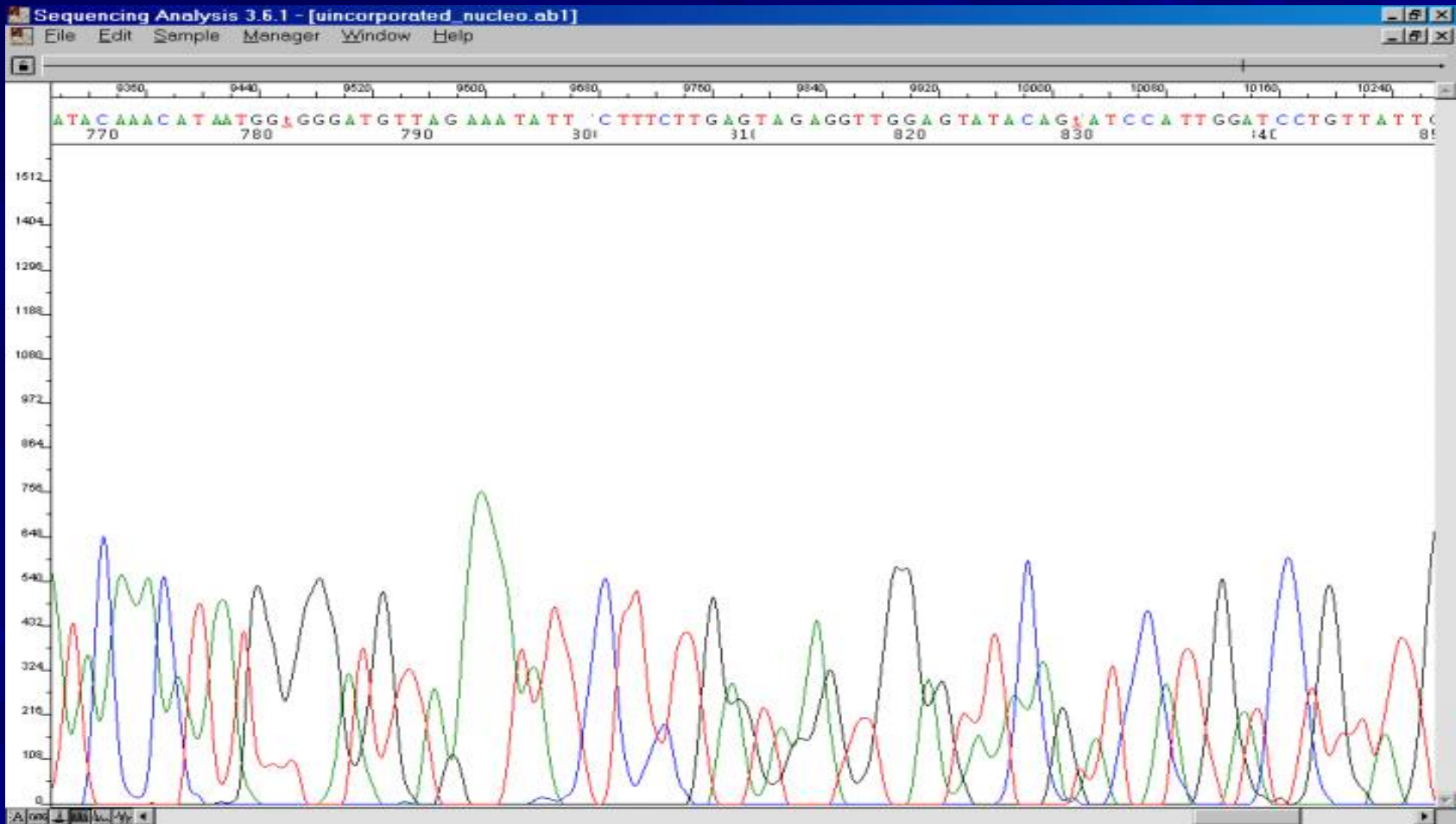
ANALIZADORES AUTOMANTICOS



SECUANCIADOR AUTOMATICO ADN



RESULTADOS DEL ANALISIS DE ADN EN ANALIZADOR AUTOMATICO



EL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE

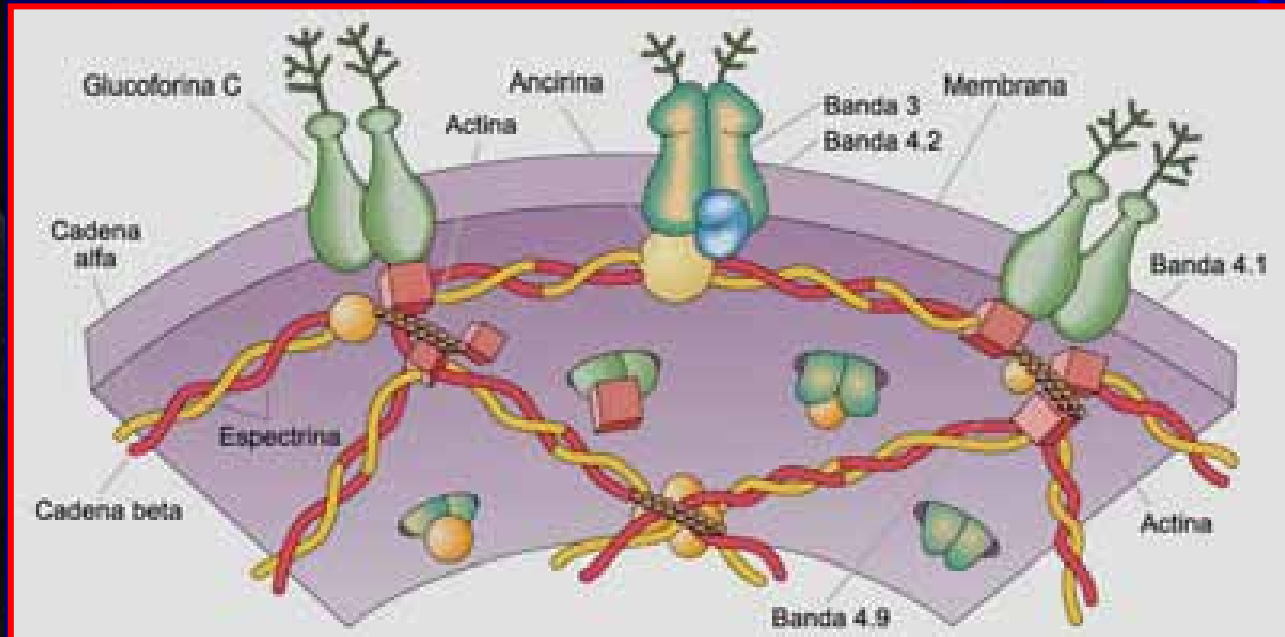


El laboratorio de Genética Forense

- De los requerimientos.
- De los peritos forenses.
- De la seguridad del personal.
- De las muestras biológicas e indicios.
- Comunicación de resultados.
- De los programas de garantía de calidad de los LGF.
- Aplicaciones de la prueba del DNA en el campo forense.

MARCADORES GENÉTICOS. IMPORTANCIA ANTROPOLÓGICA Y BIOMÉDICA

Diagrama del citoesqueleto y proteínas integrales del plasmalema eritrocítico.



Fotomicrografía de exploración de GR circulantes

MARCADORES GENÉTICOS ...

ANTÍGENOS DE MEMBRANA EITROCITARIA:

- Grupos sanguíneos, Sistemas: ABO, Rh-Hr, MNSs, Duffy, P, Kidd, Kell, secretor y de Lewis, Diego.

ANTÍGENOS DE MEMBRANA LEUCOCITARIA:

- Sistema HLA

PROTEÍNAS ERITROCITARIAS:

- Hemoglobinas (HB)
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

MARCADORES GENÉTICOS EXTRAERITROCITARIOS:

- Haptoglobinas (HP)
- Componentes de grupo específico (GC)
- Transferrina (Tf)
- Albúmina

Marcadores genéticos ...

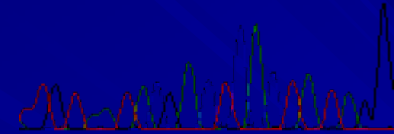
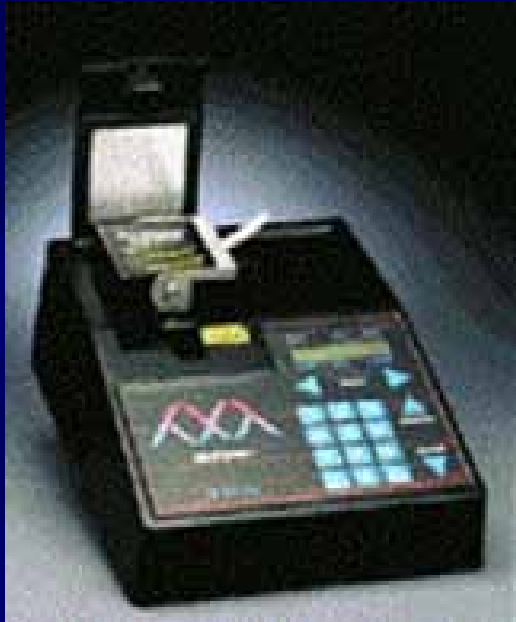


POLIMORFISMOS DE DNA

La huella genética o
perfil del DNA.

Criterios para la
selección de
marcadores genéticos.

Estandarización de Técnicas Moleculares de Aplicación en Genética Forense



T G C T T C T C A C T
A C G A A G A G T G A

1. TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

- Técnica de extracción FTA (Gibco BR)
- Extracción de DNA en mezclas de secreción vaginal, sangre o semen.
- Extracción de DNA a partir de muestras de sangre.
- Extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica.
- Extracción de DNA a partir de sangre, método Gen Elute (Sigma).
- Extracción de DNA de apéndices pilosos.
- Extracción de DNA a partir de manchas (DLB).

1. TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

- Extracción de DNA en manchas de fluidos biológicos diversos.
- Extracción de DNA a partir de restos óseos.
- Extracción con fenol-cloroformo.
- Extracción de DNA a partir de células de mucosa bucal.
- Protocolo de extracción de DNA de tejidos diversos.
- Extracción de DNA con el protocolo Wizard DNA Purification Kit.

2. EVALUACIÓN DE LA CANTIDAD, INTEGRIDAD Y CALIDAD DE LAS MUESTRAS AISLADAS

- Preparación del gel de agarosa al 2.0%
- Evaluación del estado del DNA por electroforesis de agarosa.
- Preparación de geles de poliacrilamida.

3. PCR Y ANÁLISIS DE REGIONES HIPERVARIABLES DEL GENOMA

- PCR-KIT-RED Extract N-Amp Blood PCR kits.
- PCR del genoma total.
- Regiones hipervariables del genoma.
 - Marcadores STRs autosómicos.
 - Características de los productos amplificados.
 - Elaboración del gel 5% PAGE de caracterización alélica.
 - Electroforesis y detección de los productos amplificados.
- Caracterización de secuencias polimórficas del cromosoma Y.

4. OTRAS TÉCNICAS LABORATORIALES

- Digestión del DNA con la enzima de restricción Hae III.
- Precipitación de las muestras digeridas.
- Separación de los fragmentos de DNA por electroforesis.
- Secado del gel.
- Marcación de la Sonda (CAC)₅ con ³²P.
- Hibridación de la Sonda radiactiva al DNA inmovilizado en el gel seco.
- Exposición autorradiográfica del gel hibridado.
- Caracterización genética del Sistema HLA Clase I.
- Detección de polimorfismos.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

ASPECTOS POBLACIONALES Y BIOESTADÍSTICA DE LAS PRUEBAS DEL DNA



El equilibrio de *Hardy-Weinberg*

	♂	A	a
♀			
A		A/A (p ²)	A/a (pq)
a		A/a (pq)	a/a (q ²)

$$(p+q)^2 = p^2 + 2 pq + q^2 = 1$$

AA Aa aa

PARAMETROS ESTADISTICOS

- Los marcadores polimórficos deben presentar un grado razonable de polimorfismo.
- Es necesario conocer como se distribuyen en la población sus distintas formas alélicas.
- PE (probabilidad de exclusión de paternidad)
- Para los sistemas genéticos codominantes de dos alelos: $PE = pq(1-pq)$
 - p y q representan las frecuencias génicas de los alelos bajo consideración.
 - Heterocigosidad (H): Parámetro indicativo de la cuantía del polimorfismo y eficacia de cada marcador.
 - El polimorfismo de los marcadores genéticos debe darse en varias poblaciones o en toda la población humana.

Calculo de la paternidad

- La exclusión de la paternidad es la demostración científica de que un varón está equivocadamente acusado de una determinada paternidad.
- Primer caso: El hijo posee un alelo que está ausente en la madre y en el presunto padre, por ejemplo:

– Presunto padre	Madre	Hijo
■ A	A	AB
■ A	A	B
■ B	B	A
■ O	O	A

- Con los STRs la exclusión definitiva debe basarse por lo menos en dos incompatibilidades.

Cálculo de la paternidad

- Segundo caso: En el hijo está ausente un alelo para el cual el presunto padre muestra ser homocigoto. Ej. 1
- Tercer caso: En el hijo esta ausente un alelo con el cual necesariamente debió haber contribuido el presunto padre. Ej.2

– Presunto padre	Madre	Hijo
■ MM	MN	NN
■ SS	Ss	ss
■ AB	O	O
■ AB	A	O

Cálculo de la paternidad

- Inclusión: compatibilidad que ocurre cuando el presunto padre posee todos los alelos de origen no materno presentes en el niño.

– Presunto padre	Madre	Hijo
■ A	O	A
■ B	O	B
■ AB	B	AB
■ O	O	O

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

Cálculo de la paternidad

■ Fórmula del teorema de Bayes: Probabilidad de paternidad.

– $W = X/X + Y$ ó $W = (X/Y)/(X/Y) + 1$

– El valor de X depende exclusivamente de los análisis realizados al trío. Se determina la probabilidad del genotipo del hijo condicionada al genotipo de los padres.

– Hijo Homocigoto (AA):

– Prob. Genotipo hijo = prob. Padre transmite A x prob. Madre transmite A.

– Hijo Heterocigoto (AB):

– Prob. Genotipo hijo = prob. Padre transmite A x Prob. Madre transmite B + prob. Padre transmite B x prob. Madre transmite A.

Cálculo de paternidad

- En Y consideramos que el padre no es el presunto padre, sino otro individuo no relacionado.
- Y corresponde a la probabilidad de transmisión del componente materno y a la frecuencia poblacional del alelo del hijo que ha recibido del padre.
- Ejemplo paternidad simple:

Individuo	Genotipo
P. Padre	aa
Hijo	ab
Madre	bc

Índice de paternidad

- $IP = \frac{\text{Pro m.-b} \times \text{Prob p. -a} + \text{Pro.m. -a} \times \text{Prob. P -b}}{\text{Pro.m. - b} \times f_a + \text{Pro. m. - a} \times f_b}$
- $IP = \frac{0.5 \times 1 + 0 \times 0}{0.5 \times f_a + 0 \times f_b}$
- $IP = 0.5/0.5 f_a$
- $IP = 1/ f_a$
 - Este cálculo se hace de igual manera para todos los sistemas estudiados y al final se multiplican todos los IP.

Cálculos de paternidad

P. padre	Hijo	Madre
ab	ac	cd
11/12	11/12	11/12
9/10	9/12	9/12
11/15	15/21	21/30

	X	Y
1) ac, ad, bc, bd	0.25	0.25 f(a)
2) 11/11, 11/12, 12/11, 12/12	0.5	0.5 f (11+12)
3) 9/9, 9/12, 10/9, 10/12	0.25	0.5 f (9+12)
4) 11/21, 11/30, 15/21, 15/30	0.25	0.25 f (15)

$$IP = XT/YT, W = IPT/ IPT + 1$$

- Otros vínculos biológicos: empleo de coeficientes Kinship
- Vínculos biológicos diversos como hermandad, tío-sobrino, entre primos, abuelos-nieto, etc.
 - Para cualquier locus autosómico, K es la probabilidad que un pariente pueda heredar un alelo por descendencia.
Se pretende establecer la relación entre dos personas s_1 y s_2 cuyos genotipos observados son S_1 y S_2 respectivamente.
 K_2 : Probabilidad que ambos alelos en s_1 sean idénticos por descendencia a los alelos de s_2 .
 $2K_1$: Probabilidad que uno de los alelos de s_1 sean idénticos a un alelo de s_2 y el segundo alelo de s_2 no es idéntico.

Otros vínculos biológicos

- K_0 : Probabilidad de que ninguno de los alelos de s_1 sean idénticos por descendencia a los alelos de s_2 .
- $K_2 + 2K_1 + K_0 = 1$
- Ej. Establecer vínculos de parentesco entre nieto y abuelo para los siguientes marcadores:

– Abuelo	Nieto
– 12/15	9/8
– 7/13	10/9
– 9/13	9/13
– 8/10	10/12
– Para esa relación: $K_2 = 0$, $2K_1 = \frac{1}{2}$, $K_1 = \frac{1}{4}$, $K_0 = \frac{1}{2}$	
– $X = 0 \times K_2 + 0 \times K_1 + 2cd \times K_0$	
– $Y = 2 \text{ cd}$	

BASES GENÉTICAS DE LAS PRUEBAS DE PATERNIDAD

■ Leyes de la herencia

- Ley de la segregación: Los miembros de un par de alelos se separan y distribuyen en células o gametos diferentes.
- Ley de la distribución independiente: Los miembros de pares de genes ubicados en loci diferentes se segregan independientemente unos de otros al formarse las células germinales.
- La molécula de la herencia es el ADN. La base de los Estudios de Filiación Biológica reside en el material genético.

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

