

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA**  
**INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD, DR. LUIS FELIPE MONCADA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**



**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE**  
**LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**TEMA:**

**FRECUENCIA DE ALELOS PREDOMINANTES EN LA POBLACIÓN DE NICARAGUA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ADN HUMANO UTILIZANDO MARCADORES MICROSATELITES DEL KIT GLOBALFILER EXPRESS.**

**AUTORAS:**

**BR. MARILYN SEVILLA GUTIÉRREZ**

**BR. YELITZA ANTONIA OLIVAS CONTRERAS**

**BR. KEYLING YOSKORY MONTIEL CRUZ**

**TUTOR: MSc. JUAN CARLOS LOAISIGA VARGAS**

**ASESORA METODOLÓGICA: MSc. MARTHA XIOMARA GUERRERO**

**MANAGUA, NICARAGUA MARZO 2017**



## **DEDICATORIA**

Primeramente a Dios por habernos permitido llegar hasta este punto con salud, y darnos lo necesario para seguir adelante y brindarnos conocimiento para realizar este trabajo monográfico.

A nuestros padres, como agradecimiento de su esfuerzo, amor y apoyo incondicional, durante nuestra formación tanto personal como profesional.

A nuestros docentes, por brindarnos su guía y sabiduría en el desarrollo de este trabajo.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Laboratorio de ADN del Instituto de Medicina Legal (IML) quienes nos permitieron tener acceso a los datos para llevar a cabo el estudio de las frecuencias alélicas.

Al MsC. Juan Carlos Loaisiga Vargas quien fue nuestro tutor, su ayuda constante fue fundamental para el desarrollo de este trabajo monográfico.

A nuestra asesora metodológica MsC. Martha Xiomara Guerrero, quien tuvo toda la disposición para ayudar a la redacción del documento.

Agradecemos a Lic. María Soledad Mendoza Salty por su contribución metodológica.



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de alelos predominantes en la población de Nicaragua mediante la detección de ADN humano utilizando marcadores microsatélites del Kit GlobalFiler Express, para ser utilizadas en casos de paternidad y genética forense. Las repeticiones cortas en tandem o STRs (short tandem repeats), son los marcadores polimórficos más utilizados en genética forense, la cual se dedica a la identificación de personas, criminalística y pruebas de parentesco. El estudio fue descriptivo retrospectivo de corte transversal, donde se analizó la información contenida en archivos del laboratorio de ADN del instituto de Medicina Legal (IML), correspondiente a pruebas de paternidad. El universo lo conformaron 750 personas que acudieron a realizarse pruebas de ADN, del cual obtuvimos mediante un muestreo probabilístico una muestra de 500 perfiles genéticos que corresponden a padres y madres, provenientes de 15 departamentos y dos Regiones Autónomas de la Costa Caribe (norte y sur). Se estudiaron 21 marcadores microsatélites que poseen un elevado grado de polimorfismo y heterocigocidad. Los resultados encontrados en el estudio determinan que los alelos más frecuentes en la población nicaragüense fueron los siguientes:

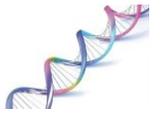
<b>CSF1PO</b>	10,11,12	<b>D19S433</b>	13,14,15	<b>D2S1338</b>	19,20,23
<b>D12S391</b>	18,19, 20	<b>D2S441</b>	10,11,14	<b>D10S1248</b>	13,14,15
<b>D13S317</b>	9,11,12	<b>D16S539</b>	10,11,12	<b>D3S1358</b>	15,16,17
<b>D7S820</b>	10,11,12	<b>D21S11</b>	29,30	<b>D8S1179</b>	13,14
<b>FGA</b>	23, 24, 25,	<b>D5S818</b>	11,12	<b>D18S51</b>	14,15,17
<b>SE33.</b>	18	<b>D1S1656</b>	15,16, 17.3	<b>D22S1045</b>	15,16
<b>TPOX</b>	8,11	<b>vWA</b>	16,17,18	<b>TH01</b>	6, 7

Los resultados analizados determinan que la probabilidad de coincidencia y poder de discriminación combinado para los 21 marcadores es de 0.000000001 y 0.999999999 respectivamente, también se determina que el porcentaje de heterocigotos promedio en la población es de 78% y 22% para homocigotos. Los resultados contribuyen a establecer una base de datos representativos de Nicaragua, misma que es útil en las pruebas forenses y de parentesco basadas en los perfiles de ADN.



## INDICE

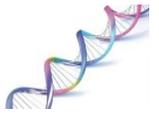
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	<b>6</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>11</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>VI. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>6.1. Generalidades</b> .....	<b>13</b>
<b>6.2. Genomas humanos y los tipos de herencia</b> .....	<b>14</b>
<b>6.3. Genética forense</b> .....	<b>19</b>
<b>6.4. Genética poblacional</b> .....	<b>21</b>
<b>6.5. Polimorfismos</b> .....	<b>22</b>
<b>6.6. Extracción de ADN</b> .....	<b>29</b>
<b>6.7. Amplificación de ADN</b> .....	<b>29</b>
<b>6.8. Secuenciación de ADN</b> .....	<b>36</b>
<b>6.9. Globalfiler express PCR kit de amplificación</b> .....	<b>39</b>
<b>6.10. Valoración estadística en genética forense</b> .....	<b>40</b>
<b>VII. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	<b>44</b>
<b>VIII. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES</b> .....	<b>48</b>
<b>IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>XI. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>70</b>
<b>XIII. ANEXOS</b> .....	<b>75</b>



## I. INTRODUCCION

La genética es el estudio de la herencia y la variación biológica en los organismos, puede ser considerado como una base individual, donde los rasgos particulares son heredados de padres a hijos. En las células humanas el ADN localizado en el núcleo es denominado ADN nuclear organizado en cromosomas. El genoma humano consta de 22 pares de cromosomas autosómicos y dos cromosomas sexuales, muchas pruebas de identificación humana son realizadas usando marcadores en cromosomas autosómicos y determinando el género sobre los cromosomas sexuales. El ADN se compone por regiones “codificantes” (exones) y “no codificantes” (intrones). Los marcadores usados en pruebas de identificación humana se encuentran dentro de los genes que no codifican en las variaciones genéticas. Las pequeñas variaciones en el ADN individual permite la diferencia entre las personas, las diferentes formas de un mismo gen o marcador es llamado alelo, si los alelos de un lugar en particular (locus) en el genoma son los mismos en ambos pares de cromosomas, la situación es llamada homocigoto, si una pequeña diferencia está presente en un locus en específico, la diferencia alélica será llamada heterocigoto. El genotipo es el contenido genético de un individuo en forma de ADN y se define como el conjunto de genes de un organismo, el fenotipo es la manifestación física o externa de un gen.

La prueba de ADN está consolidada científicamente y de gran peso ante los tribunales a nivel mundial. El avance tecnológico y científico en marcadores genético moleculares ha permitido el desarrollo de la genética forense, para la identificación de personas, restos cadavéricos, análisis de vestigios biológicos de interés criminal, distribución geográfica, investigación de paternidad y las variabilidades genéticas de la población, que se ha analizado a lo largo de los años cómo cuantificar la variación o variabilidad en las poblaciones. (*Hernández, AW, Trejo, FM. 2014*).



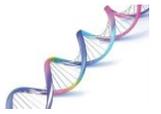
## II. ANTECEDENTES

La Biología forense comenzó con el descubrimiento en el año 1900 por Karl Landsteiner del grupo ABO y con la demostración de su herencia de este grupo en 1910. Poco después (1912) fue utilizado ya en casos de investigación biológica de la paternidad y pronto en el análisis de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre. El estudio de la variabilidad genética como medio de identificación humana inició con el análisis de los grupos sanguíneos, continuando con proteínas séricas leucocitarias y eritrocitarias, más tarde el sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).

En 1984 el genetista Alec Jeffreys de la Universidad de Leicesters desarrolló las técnicas de la huella genética y perfiles de ADN, que en la actualidad son usadas por la genética forense para resolver ciertos problemas judiciales. Alec Jeffreys y colaboradores describían este método de identificación, al que denominaron DNA finger printing o huella genética, como la solución definitiva al análisis de la diversidad humana en medicina legal, investigación biológica de paternidad y en criminalística.

En 1987, el uso de la “huella genética” se admitió en procesos penales en Inglaterra, Estados Unidos de América y actualmente la prueba de ADN está consolidada científicamente y de gran peso ante los tribunales a nivel mundial. El avance tecnológico y científico en marcadores genético moleculares ha permitido el desarrollo de la genética forense, para la identificación de personas, restos cadavéricos, análisis de vestigios biológicos de interés criminal, investigación de paternidad y las variabilidades genéticas de la población.

Estados Unidos realizó un proyecto para la creación de una Base de Datos a nivel Nacional involucrando los STR (repeticiones cortas en tandem), que comenzó en abril de 1996 y concluyó en noviembre de 1999 participando 22 laboratorios de tipificación de ADN evaluando 17 candidatos de STR loci. Los 13 STR loci elegidos formaron parte de la base de datos nacional de ADN del CODIS (Combined DNA Index System) fueron: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11. Los 3 marcadores con mayor polimorfismo fueron: FGA, D18S51 y D21S11, TPOX, los cuales mostraron la menor variación entre individuos.



En 2013 se realizó un estudio de análisis de los loci mini STRs D10S1248, D14S1434 y D22S1045 en la población de Bogotá, Colombia con fines genético poblacionales y forenses, utilizando dos métodos: PowerPlex (17 loci) y GlobalFiler (24 loci), con el objetivo de contribuir a la caracterización de la estructura genético poblacional.

En 2014, México, Alejandra Hernández Rodríguez y Flor de María Trejo Medinilla, efectuaron un estudio genético poblacional de frecuencias alélicas para 15 marcadores STR presentes en la población del estado de Zacatecas aplicado a la práctica forense, los cuales obtuvieron las frecuencias alélicas de la población zacatecana encontrando alelos que no se habían reportado en estudios con poblaciones similares, empleando estos datos en casos forenses de manera exitosa y con resultados más exactos.

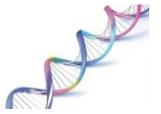
En 1999 se funda el Centro de Biología Molecular (CBM), se estableció en la facultad de ciencia y tecnología de la Universidad Centroamericana (UCA) de nuestro país, se convirtió en el primer centro de investigación molecular del país. Este centro realizó un estudio de caracterización de la población nicaragüense mediante el uso de 8 marcadores STR. El Centro estableció la primera base de datos genéticos de Nicaragua, publicada en el *Journal of Forensic Sciences* 2002.

En el año 2005 se funda el laboratorio de ADN en el Instituto de Medicina Legal e inició operaciones el 15 de Junio de 2009. El laboratorio cuenta con personal altamente calificado, recursos tecnológicos modernos y la metodología científica más exacta y confiable, dichas características han permitido que el laboratorio realice estudios actualizados de frecuencias alélicas en la población nicaragüense. En el año 2010, determinaron las frecuencias alélicas y parámetros forenses para 15 loci STR autosómicos, con una muestra de 200 donantes sanos nicaragüenses, el ADN se extrajo de tarjetas de FTA y las amplificaciones de PCR se realizaron usando el kit de PowerPlex 16 de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Los productos amplificados se analizaron utilizando un ABI 310 y las designaciones de los alelos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión de ADN de la ISFG (International Society Forensic Genetics), con la ayuda de escaleras alélicas proporcionadas por los fabricantes.



En el año 2012, Calero W., Osorio J. y Paizano T., realizaron un estudio monográfico de frecuencia de alelos predominantes en población de Nicaragua mediante el análisis de ADN humano utilizando 15 marcadores microsatélites. Los resultados encontrados en el estudio determinaron que la probabilidad de coincidencia y poder de discriminación combinado para los 15 marcadores fue de 0.000000001 y  $> 0.999999999$  respectivamente, también se determinó que el porcentaje de heterocigotos promedio en la población fue de 78.28 %.

Actualmente en Nicaragua no existen estudios de 21 marcadores microsatélites utilizando la técnica Globalfiler Express, que permitan una mayor precisión en la probabilidad de coincidencia y poder de discriminación en casos forenses.



### III. JUSTIFICACIÓN

El análisis de marcadores genéticos se emplea fundamentalmente en el campo de la Genética Forense con el objetivo de obtener perfiles genéticos para resolver casos de identificación de cadáveres, criminalística o de parentesco.

Este trabajo impulsado por el Laboratorio de ADN del Instituto de Medicina Legal (IML), se basa en la frecuencia genética poblacional nicaragüense, utilizando la técnica de GlobalFiler Express, que utiliza 24 loci incluyendo 10 mini-STRs, para un máximo de 9 órdenes de magnitud, más poder de discriminación ( $7.12 \times 10^{-26}$ ) que los kits de la generación anterior, ayuda a reducir el riesgo de coincidencias de base de datos adventicias y aumenta la capacidad de recuperación de información de muestras difíciles.

Esta investigación fue realizada con el interés de determinar la frecuencia de los alelos utilizados en el kit Globalfiler Express presentes en la población de Nicaragua, lo cual ayudará a dar valoraciones estadísticas más contundentes en las investigaciones realizadas por la genética forense, esto brindará mayor criterio a los judiciales en la sentencia que se da para casos civiles y penales de los juicios que a diario se llevan a cabo en los tribunales de Nicaragua. Además de mostrar que la técnica de Globalfiler Express tiene la capacidad de amplificar la muestra hasta 5 veces más rápido que las técnicas antes usadas por el laboratorio, las características de esta técnica hacen que este estudio sea de magnitud importante ya que los resultados beneficiarán a la población en casos de paternidad, identificación de cadáveres, violaciones y otros casos forenses y criminalísticos. También reduce el tiempo de entrega de resultados.



#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

**Caracterización:** La genética de poblaciones estudia la composición genética del individuo, establece la variación de distintos locus, trata de explicar las posibles causas de esa variación. Todos los marcadores genéticos se encuentran en la población con determinada frecuencia, siendo importante determinar su presencia en la población nicaragüense.

**Delimitación:** El análisis de frecuencia alélica mediante marcadores microsatélites es la principal herramienta de la genética forense por sus características únicas. GlobalFiler Express es uno de los métodos de estudio más precisos, permite llevar a cabo los análisis de marcadores genéticos con certeza absoluta. Este perfil genético determina a cada individuo de acuerdo con los marcadores genéticos analizados, cuanto mayor sea el número de estos marcadores, mayor será la certeza para la identificación del individuo, lo cual es una de las ventajas del método GlobalFiler Express en cuanto a otros métodos usados anteriormente en nuestro país.

**Formulación:** Para la realización de este estudio nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la frecuencia de alelos predominantes en la población de Nicaragua?

##### **Sistematización**

1. ¿Qué resultados se obtendrán al identificar mediante métodos estadísticos los alelos más frecuentes en la población nicaragüense?
2. ¿En qué influirán los análisis de los parámetros estadísticos forenses; poder de discriminación y probabilidad de coincidencia?
3. ¿Cuál es la variabilidad genética en la población nicaragüense mediante el estudio de personas heterocigotas y homocigotas?
4. ¿Cómo se elabora un archivo actualizado de datos genéticos de la población nicaragüense?



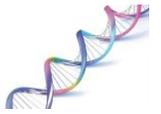
## V. OBJETIVOS

### **General**

Determinar la frecuencia de alelos predominantes en la población de Nicaragua mediante la detección de ADN humano utilizando marcadores microsatélites del Kit GlobalFiler Express, Octubre –Noviembre 2016.

### **Específicos**

1. Identificar mediante métodos estadísticos los alelos más frecuentes en la población nicaragüense.
2. Analizar los parámetros estadísticos forenses; poder de discriminación y probabilidad de coincidencia.
3. Determinar la variabilidad genética en la población nicaragüense mediante el estudio de personas heterocigotas y homocigotas.
4. Crear un archivo actualizado de datos genéticos de la población nicaragüense.



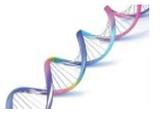
## VI. MARCO TEÓRICO

### 6.1. Generalidades

La genética es el estudio de la herencia y la variación biológica en los organismos, los rasgos particulares son heredados de padres a hijos, existen pequeñas variaciones en el ADN que hacen la diferencia entre personas, las diferentes formas de un mismo gen o marcador es llamado alelo y se define como las múltiples variaciones de un gen o secuencia de ADN en la población, donde cada par de alelos conformará un genotipo, encontrándose dentro de la población con determinada frecuencia, sin embargo, existen cuatro fuerzas: la selección, deriva génica, mutación y migración; que determinan la frecuencia de los mismos. Los marcadores en ADN forense son populares por trabajar con poca cantidad de ADN e incluso degradado, son manejables para la automatización, son altamente discriminatorios, con resultados fáciles de interpretar y de comparar.

El estudio de la variabilidad genética se consolidó en 1985 cuando Alec Jeffreys describió la huella genética, esta se utiliza para el análisis de la diversidad humana en medicina legal, investigación biológica de paternidad y en criminalística. Actualmente uno de los desarrollos técnicos más importantes en el campo de las pruebas de identificación humana es el uso de la caracterización del ADN a partir de evidencias biológicas. Los microsatélites en cromosomas autosómicos (STRs) son actualmente los marcadores más utilizados, pero los polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) van emergiendo como marcadores de futuro y son ya útiles para muchas aplicaciones específicas, al igual que ocurre con polimorfismos en cromosomas sexuales o el ADN mitocondrial que son herramientas fundamentales para los investigadores forenses. (*Carracedo, A. 2013*).

Los análisis más detallados de diferenciación de ADN pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos. Hasta hace poco tiempo, el uso extenso de secuencias de ADN para los estudios de poblaciones no habían sido prácticos porque los fragmentos de ADN para cada individuo tenían que ser aislados para librerías de ADN subgenómico después de haber sido identificados por southern blotting e hibridación.

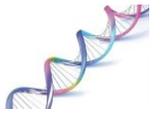


Sin embargo, actualmente el uso de secuencias es muy común: se ha aplicado en análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos. (Ayala, F.J. 2001)

En los últimos 20 años, los nuevos avances tecnológicos, sobre todo, la invención de la PCR, han permitido profundizar más aún en el conocimiento de la diversidad genética humana. Han sido descritos nuevos marcadores directamente sobre la molécula del ADN mitocondrial y nuclear, lo cual ha ampliado el conocimiento de la diversidad humana a las regiones no codificantes de nuestro genoma o a aquellos cambios estructurales sobre genes codificantes que no provocan sustituciones de aminoácidos sobre las proteínas. Así, se han aplicado técnicas para la identificación de fragmentos de ADN y se han reconocido polimorfismos de repeticiones en tándem (VNTRs y STRs). También amplias regiones del genoma están representadas por secuencias SINE y LINE, alguna de las cuales son utilizadas en el análisis de la variabilidad actual. Los últimos avances se relacionan con los estudios de SNPs, es decir, alteraciones mínimas en la secuencia del genoma, a nivel de un solo nucleótido. También la secuenciación directa de fragmentos concretos permite analizar regiones hipervariables. (Butler, J.M. 2005)

## **6.2. Genomas humanos y los tipos de herencia.**

El genoma humano es un término que se utiliza para describir el contenido total de ADN (que es la molécula portadora de la información genética) en cada célula humana y contiene el conjunto de instrucciones (código genético) para la síntesis de las proteínas, las cuales son, en última instancia, las responsables de la fisiología y morfología de las células que, a su vez, son los componentes básicos de todos nuestros tejidos y órganos. Todas y cada una de los trillones de células que componen nuestros tejidos y nuestros órganos (excepto las células sexuales: el espermatozoide y el óvulo, que han reducido a la mitad el contenido del ADN y determinadas células como los glóbulos rojos de la sangre que han perdido su núcleo celular) son portadoras del mismo conjunto de instrucciones genéticas (de un mismo genoma). Por lo tanto, independientemente del órgano o tejido del que extraigamos el ADN de un mismo individuo, el perfil genético que obtengamos será el mismo.

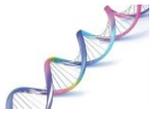


Este es el principio básico de universalidad del genoma en el que se basa el análisis genético comparativo que se lleva a cabo entre la muestra dubitada (en general un vestigio biológico: sangre, semen, saliva pelos, tejidos, restos epidérmicos) y una muestra de referencia indubitada (en general sangre o saliva) extraída de la persona de la que se sospecha pueda haber dejado el indicio biológico dubitado. Independientemente del tejido u órgano de procedencia el perfil genético que se obtenga será el mismo si vestigio y muestra de referencia provienen de la misma persona.

Otra característica fundamental que hace del genoma humano una herramienta aplicable al campo de la identificación humana es su diversidad. Es decir, el código genético (que es idéntico en todas las células de un mismo individuo) presenta variaciones en los distintos individuos de la población. Este principio de diversidad nos ofrece la posibilidad de obtener un código genético identificador que teóricamente permite distinguir de forma precisa a cada individuo de una población (con la excepción de los gemelos idénticos o univitelinos). La precisión o la fiabilidad de dicha identificación vendrá limitada fundamentalmente por dos factores: el tipo de análisis de ADN comparativo que pueda realizarse y las posibles relaciones de parentesco genético entre los individuos que hay que diferenciar en el análisis genético.

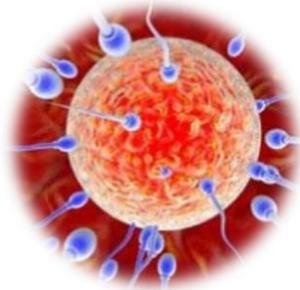
Una tercera característica del genoma es su estabilidad en muestras forenses. La molécula de ADN presenta en condiciones normales una gran estabilidad tanto en fluidos biológicos que forman manchas secas (sangre, semen, saliva) sobre distintos soportes como a partir de diversos tejidos humanos incluso mucho después de la muerte. Es posible, pues, obtener y descifrar la secuencia de parte del material genético a partir de un gran número de vestigios biológicos de interés forense para obtener su perfil genético identificador y compararlo con el obtenido a partir de una muestra de referencia de la persona de la que se sospecha proviene el vestigio. (*Antonio, AA. 2015*).

La información genética de las células humanas se organiza en dos genomas: El gran genoma nuclear de herencia compartida por ambos progenitores y el pequeño genoma mitocondrial que transmiten exclusivamente las madres en sus óvulos.



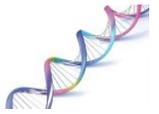
## El ADN nuclear: La herencia compartida de los padres

El genoma nuclear se localiza como su propio nombre indica en el núcleo celular y representa el 99 % del contenido de ADN celular total. Se encuentra asociado de forma muy específica a ciertas proteínas formando unas estructuras filamentosas denominadas cromosomas que pueden ser visualizadas al microscopio en el núcleo de las células en división. Un cigoto humano tiene 23 pares de cromosomas (46 cromosomas), un miembro de cada par proviene de la madre, mientras que el otro proviene del padre. Por el contrario, las células reproductoras (óvulo y espermatozoide) durante su formación reciben al azar solamente un miembro de cada par, es decir solo tienen 23 cromosomas. El número de cromosomas volverá a ser de 46 tras la fertilización del óvulo por el espermatozoide y de este modo se mantendrá constante el número de cromosomas a través de las generaciones.

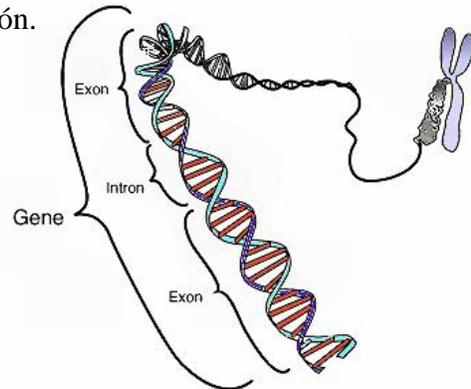


Un cromosoma es básicamente una fina hebra de ADN rodeada por otros componentes, fundamentalmente proteínas. La molécula de ADN, portadora de la información genética, es una larga cadena doble compuesta de una unidad química que se repite a lo largo de la cadena: el nucleótido. El componente fundamental de un nucleótido son las bases nitrogenadas. Existen cuatro tipos de bases A, G, T y C (A: Adenina, G: Guanina, T: Timina y C: Citosina) cuya ordenación a lo largo de la cadena del ADN será lo que determine la información genética.

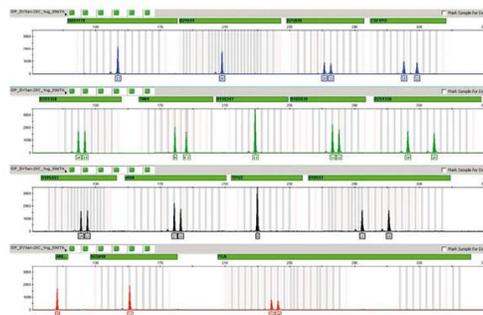
La cantidad total de ADN de una célula es alrededor de 3.000 millones de nucleótidos. Un gen es un segmento de ADN (cuyo tamaño puede variar entre 3.000-100.000 nucleótidos) que contiene la información para la síntesis de una proteína. Se estima que el número de genes humanos es de 30.000, siendo desconocida en la actualidad la función de más del 50% de estos genes. Sin embargo, estos 30.000 genes solo representan una pequeñísima fracción (2-3%) del ADN total de una célula.

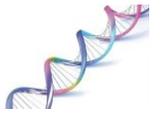


El resto de ADN, que representa la fracción mayoritaria del genoma nuclear humano, está compuesto en gran parte de secuencias de ADN repetitivo sin una función clara y que se suele denominar «ADN no codificante» en el sentido de que no codifica información para la síntesis de proteínas. Es precisamente una fracción de este ADN no codificante la que más interés tiene en genética forense, ya que se trata de regiones de ADN con una gran variabilidad de tamaño entre los individuos de la población.



Las regiones de ADN no codificante de mayor interés en genética forense son las denominadas regiones de ADN microsatélite. Se trata de pequeñas regiones ADN repetitivo en tándem (de 100-500 nucleótidos) compuestas por una secuencia (de 4-5 bases) que se repite en tándem n veces. Es precisamente el número de veces que se repite esta unidad de secuencia lo que presenta una gran variabilidad entre los individuos de una población. De aquí que a estas regiones se las denomine STRs (del inglés: Short Tandem Repeats: repeticiones cortas en tándem). Hoy en día, la mayoría de los análisis forenses de ADN se basan en el estudio simultáneo de un conjunto de 10 a 15 de estas regiones cortas distribuidas en los distintos cromosomas humanos. Un perfil genético no es más que el patrón de estos fragmentos cortos de ADN ordenados por su tamaño. Dicho patrón es fácilmente convertible en un sencillo código numérico muy fácil de almacenar, manejar y comparar, ofreciendo un alto poder de discriminación genética tanto en la identificación de vestigios biológicos de interés en la investigación criminal como en la investigación biológica de la paternidad ya que estos perfiles genéticos tienen una procedencia del 50% paterna y 50% materna.

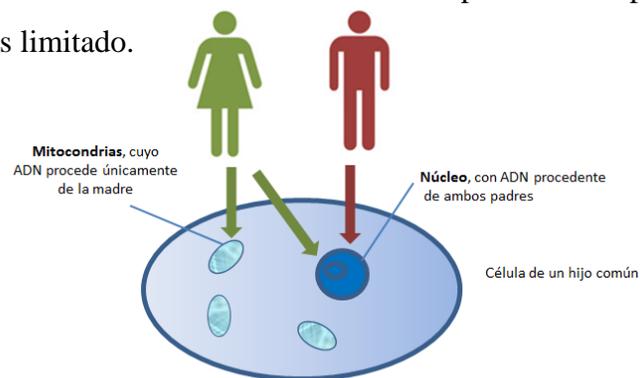




## El ADN mitocondrial: La herencia materna

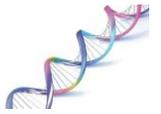
Además del ADN nuclear, las células humanas contienen un pequeño genoma circular (de 16.569 nucleótidos) que se encuentra dentro de las mitocondrias (los orgánulos celulares del citoplasma celular cuya función principal es la producción de energía) y que se hereda exclusivamente por la vía materna ya que las mitocondrias son aportadas por el citoplasma del óvulo y no por el espermatozoide. El ADN mitocondrial también presenta variabilidad genética (en la secuencia del ADN) y, por lo tanto, es una herramienta muy útil en la identificación genética humana. Se trata, además, de un genoma cuyo estudio ofrece una ventaja importante con respecto al estudio del ADN nuclear: Su gran sensibilidad.

Es un genoma que se presenta en un gran número de copias (hay 100-10.000 copias de ADN mitocondrial por cada copia de genoma nuclear, según el tipo celular) y, por tanto, será de aplicación en muchos casos en los que no sea posible la obtención de ADN nuclear (tallos de pelos, restos óseos antiguos). Sin embargo la variabilidad genética del ADN mitocondrial es menor que la observada mediante el análisis de las secuencias de ADN repetitivo del gran genoma nuclear. Como consecuencia de su menor variabilidad, el perfil genético que se obtiene mediante el estudio del ADN mitocondrial presenta un poder discriminación en general mucho más limitado.



La desigual transmisión del ADN

Si el ADN mitocondrial se hereda de forma inalterada de madres a hijos todos los miembros de una familia que compartan la línea materna tendrán el mismo perfil de ADN mitocondrial. Es decir, que este tipo de ADN más que perfiles individuales permite identificar linajes maternos.



## **El cromosoma Y: La herencia paterna de los varones**

Hay una parte del genoma nuclear que es específico del varón, se trata del cromosoma Y. En la especie humana el sexo está determinado por los cromosomas sexuales X e Y de tal forma que el genoma de las mujeres está contenido en 22 parejas de autosomas y dos cromosomas X (46, XX), y el de los varones es de 22 parejas de autosomas más un solo cromosoma X y un cromosoma Y (46, XY). El cromosoma Y se transmite exclusivamente por vía paterna a la descendencia de varones de manera más o menos inalterada a lo largo de las generaciones. En este cromosoma existen también regiones cortas de ADN repetitivo variables en tamaño, cuyo estudio permite en este caso trazar linajes paternos separados incluso varias generaciones. Además el cromosoma Y es una herramienta que permite obtener un patrón genético específico del varón, lo cual tiene un gran interés práctico en la identificación genética de restos de semen y otros fluidos biológicos del supuesto agresor en los casos de agresiones sexuales a mujeres.

El análisis de regiones cortas de ADN repetitivo del cromosoma Y que hoy se realiza de rutina ofrece también un poder de discriminación más bajo que el normalmente obtenido mediante el estudio de las regiones STR autosómicas. No olvidemos que, en último término, el análisis genético del cromosoma Y no permite diferenciar genéticamente a los miembros de una familia que compartan la misma línea paterna. (*Antonio AA. 2015*).

### **6.3. Genética forense**

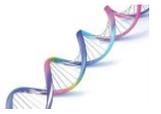
La genética forense es una especialidad de la genética que incluye un conjunto de conocimientos necesarios para resolver ciertos problemas jurídicos. Los tipos de pericia más solicitados al laboratorio de genética forense por los tribunales son casos de investigación biológica de la paternidad, pericias de criminalística biológica (estudio de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre, esperma, pelos, etc.) y, finalmente problemas de identificación.



La genética forense comenzó con el descubrimiento en el año 1900 por Karl Landsteiner del grupo ABO y con la demostración de su herencia de este grupo en 1910. Poco después (1912) fue utilizado ya en casos de investigación biológica de la paternidad y pronto en el análisis de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre. Nuevos antígenos eritrocitarios polimórficos, esto es con una proporción significativa de variantes alélicas en la población, y que se heredaban de forma mendeliana simple como el Rh, MNSs o Duffy fueron progresivamente incorporados al panel de marcadores genéticos de que disponíamos los genetistas forenses.

La aparición de polimorfismos proteicos y enzimáticos de eritrocitos y leucocitos analizados por técnicas electroforéticas supuso, principalmente a partir de 1960 se dispusiese de marcadores más informativos y más objetivos. La introducción de los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad, HLA, supuso una gran revolución en la prueba biológica de la paternidad a partir de 1970 sobre todo tras los trabajos realizados por Wolfgang M. Sin embargo tanto los HLA como los anteriores marcadores genéticos presentaban grandes limitaciones cuando se trataba de analizar muestras degradadas o en minúscula cantidad lo que sucede con mucha frecuencia en el trabajo forense.

Particularmente la utilización de todos estos polimorfismos de expresión era muy limitada para el análisis de manchas o pelos y los problemas de identificación, y en la mayor parte de los casos criminales los genetistas forenses poco o nada podían decir sobre la persona a la que pertenecía un vestigio. Esto era particularmente cierto para el análisis de esperma o manchas de esperma y pelos o cabellos donde era excepcional proporcionar algún dato acerca de la correspondencia de un vestigio a un presunto agresor con lo que la ayuda a la justicia era muy limitada. También era imposible la realización de pruebas de paternidad en muestras degradadas (por ejemplo a partir de restos óseos) y muy difícil en casos complejos como las pruebas realizadas sin el presunto padre a partir de familiares indubitados del mismo, esta era la situación cuando se descubrieron en la década de 1980 los polimorfismos del ADN. (*Carracedo, A. 2013*).



#### 6.4. Genética poblacional

La genética de poblaciones no solo estudia la composición genética del individuo, también a la población entera, los cambios de esta a través de las generaciones y establecer la variación de distintos locus, tratar de explicar las posibles causas de esa variación e incluso establecer un modelo, siendo aplicable a todos los seres vivos. Un alelo se define como las múltiples variaciones de un gen o secuencia de ADN en la población y cada par de alelos conformará un genotipo (combinación de alelos para un gen o grupo de genes).



Todos los marcadores genéticos se encuentran en la población con determinada frecuencia, siendo importante determinar su presencia. La frecuencia de un genotipo (homocigoto o heterocigoto), varía al cambiar las frecuencias alélicas. Si existen más de dos alelos de un mismo gen, éste es considerado como polimórfico y cada nuevo alelo que surge en la población aumenta el polimorfismo del gen, para considerarlo como tal, la frecuencia del alelo más común debe ser menor al 99%, y para un alelo poco común debe superar al menos el 0.005% de frecuencia en la población; los alelos que no alcanzan estas frecuencias son considerados como raros. (Hernández y Trejo. 2014).



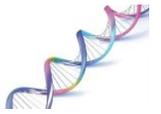
## 6.5. Polimorfismos

Las secuencias son múltiples en los organismos, los análisis de genética poblacional han permitido detectar más alelos por cada marcador, y cuantos más alelos diferentes hay es más polimórfico; es decir, hay mayor poder de identificación, ya que como existe mayor variabilidad en las secuencias, será menos probable que los individuos compartan las mismas regiones polimórficas. Se considera un polimorfismo genético cuando existen múltiples alelos de un gen en una población definida o, de manera más específica, cuando la secuencia de bases nitrogenadas de la molécula de ADN de un locus en particular es variable entre los organismos de la población.

La palabra polimorfismo está compuesta por poli (muchos), morfos (forma) e ismo (proceso o estado) es decir de muchas formas. Los ácidos nucleicos y las proteínas tienen la propiedad de presentarse en diferentes formas moleculares o múltiples alelos. Un polimorfismo puede observarse en un individuo completo (polimorfismo fenotípico), en formas variables de proteínas o grupos sanguíneos (polimorfismo bioquímico), en las características morfológicas de los cromosomas (polimorfismo cromosómico) o en el ADN, por diferencias en las secuencias nucleotídicas (polimorfismo del ADN).

Las variantes alélicas de la secuencia codificadas de genes en el ADN, debidas a procesos normales de la función celular, propician la producción de codones polimórficos y con ellos de forma alterna de las proteínas, aunque generalmente sin que se altere la función de producto sintetizado.

El polimorfismo es la región promotora del gen, lo cual influye en la expresión genética del ARN mensajero y, por ello, en la proteína que codifica (diferentes fenotipos) o inclusive identificarse en regiones no traducidas (intrones) de tal forma que no se tiene una interpretación de su función al menos conocida hasta ahora, pero siguen siendo secuencia que permiten diferenciar individuos y especies. Los polimorfismos como las mutaciones, pueden clasificarse, de acuerdo con su efecto, como polimorfismo sinónimos o silentes (los que no cambian la traducción del producto proteico en la variación de la secuencia; esto es, lo que, cuando la secuencia nucleica cambia el codón que codificaba al aminoácido original se cambia por otro que codifica para el mismo aminoácido o por otro con



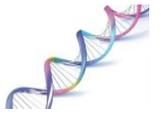
característica químicas similares), y polimorfismo no sinónimo o que producen variación en la lectura del código genético por alterar codones que cambian el sentido de la traducción de un aminoácido por otro. Además, se considera que los polimorfismos neutros, que son los que varían en su secuencia en regiones no codificable del ADN también son silentes. Un polimorfismo se considera neutro si la presencia o ausencia de un alelo no confiere ninguna ventaja al individuo. Además, un polimorfismo puede representar ventajas evolutivas para una determinada población, como conferirle resistencia a condiciones medioambientales, de acuerdo con la zona geográfica en la que habita.

El término polimórfico es útil para definir genes o alelos, e incluso se observan secuencias que varían mucho, como en alelos que definen los grupos sanguíneos y las moléculas de los antígenos leucocitarios (HLA, antígeno leucocitario humano) que constituye el complejo mayor de histocompatibilidad, a los que se le considera altamente polimórficos.

En genética el concepto básico de polimorfismo menciona que cuando un alelo en un locus en la población presenta una frecuencia de más de 1% se denomina polimórfico. Este porcentaje indica que la presencia de estas variantes es común y no se da por azar, es decir que el alelo menos común no puede mantener su frecuencia simplemente por mutación.

Los polimorfismos se acumulan en las poblaciones hasta que se tornan comunes entre especies; entonces se denominan divergencia genética. Así, con el paso del tiempo, un polimorfismo podría llegar a representarse en un alto porcentaje de una población incluso ser tan común como un alelo silvestre. Por tanto, un alelo que originalmente pudo considerarse polimórfico puede llegar a ser el alelo más común en una población.

La combinación de secuencias en los alelos que se heredan es única para cada descendiente; así, el análisis de su polimorfismo permite obtener un patrón o perfil definido único para cada organismo. A esto se le denomina huella genética (perfil genético) por su semejanza a las huellas dactilares también únicas y características de cada persona. Los polimorfismos se utilizan como marcadores genéticos para identificar o relacionar a personas, ya que al ser heredable, generalmente sin cambios de padre a hijos



permiten establecer parentescos biológicos directos, ya que comparten los mismos marcadores.

Para poder llevar a cabo estos estudios de marcadores en primer lugar hay que definir los tipos de polimorfismos genéticos, ya que pueden clasificarse de acuerdo con diferencias de estructura, forma de transmisión, distribución, estabilidad, tamaño. Dado que los métodos de estudio de identificación de polimorfismos son diversos y cada opción tiene ventajas y desventajas, la utilización de varios tipos de polimorfismos que aporten diferente información sobre su herencia e individualidad permiten obtener resultados más amplios y útiles para una interpretación adecuada.

### **Tipos de polimorfismos**

Las características de las secuencias que permiten detectar sitios polimórficos son muy variables, así, pueden diferenciarse dos tipos de polimorfismos: los que involucran cambios en un solo nucleótido y en los que intervienen deleciones o inserciones de pocos o muchos pares de bases. De acuerdo con esta clasificación, los marcadores polimórficos más utilizados para realizar un perfil genético son:

#### **a) Polimorfismos de un solo nucleótido o nucleótido único**

Los SNP (single nucleotide polymorphism) son variaciones en un solo nucleótido o par de bases en una secuencia dada. Estos polimorfos pueden estar representados por la deleción, inserción o sustitución de una base nitrogenada en la secuencia nucleótido normal.

#### **b) Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción**

Este tipo de polimorfos se evidencian mediante el uso de enzimas de restricción, que cortan determinadas secuencias de ADN. De este modo se generan fragmentos, que pueden hibridar con sondas específicas para poder reconocerlos. Si un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) afecta el sitio de restricción de una enzima, se evidenciará un polimorfismo de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).



**c) Polimorfismos con número variable de repeticiones continuas o en tándem, y con repeticiones cortas y continuas**

Los VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) y STR (short tandem repeats), se consideran microsatélites o minisatélites, es decir, loci que corresponden a secuencias cortas de ADN, repetidas en bloque o tándem un número específico de veces. La longitud de estas secuencias puede ser de pocas bases hasta algunas decenas de nucleótidos, y la cantidad de repeticiones determinara la variabilidad de alelos distintos en un mismo locus. Así, en un mismo cromosoma pueden existir regiones con diferente número de repeticiones en la población.

**d) Los polimorfismos del cromosoma Y**

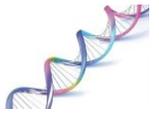
A pesar de representar solo el 2% del componente cromosómico humano, el cromosoma Y posee unas características que le diferencian del resto de los cromosomas y le confieren gran utilidad desde el punto de vista tanto forense como antropológico.

Es uno de los cromosomas humanos más pequeños, con un tamaño de aproximadamente 60 millones de pares de bases. Es acrocéntrico, se hereda como un bloque de padres a hijos, constituyendo un grupo de ligamiento. La única fuente posible de variación es producida por eventos mutacionales.

Los marcadores más interesantes a efectos forense son los microsatélites aunque los marcadores bialélicos (mayoritariamente SNPs) están empezando a tener una gran importancia por su sensibilidad para poder ser analizados en muestras mínimas y por la posibilidad de definir con precisión el haplotipo y poder así dar datos sobre el origen geográfico posible de una muestra.

En cuanto a los microsatélites comparten sus características con los microsatélites de cromosoma autosómicos, pero además presentan características específicas como:

- ✓ No sufren ningún proceso de recombinación por su localización en la región no pseudoautosomal del cromosoma Y.

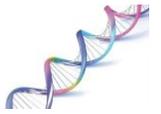


- ✓ Su herencia exclusivamente paterna, se traduce en su mantenimiento generación tras generación sin ningún otro cambio que los producidos por eventos mutacionales.
- ✓ Presentan un moderado nivel de polimorfismo cuando los comparamos con los STRs autosómicos.

La construcción de haplotipos altamente discriminativos resulta de gran utilidad en el campo forense y antropológico, y pueden ser utilizados para trazar la evolución de los linajes paternos en combinación con marcadores de evolución más lenta.

Los microsatélites localizados en el cromosoma Y, han irrumpido con gran fuerza en el panorama de los marcadores genéticos de uso forense, debido a que suponen una ayuda inestimable para ciertas situaciones forenses específicas como son algunos casos de investigación de la paternidad difíciles y especialmente casos criminales con mezcla de ADN masculino y femenino. Así, los polimorfismos de cromosoma Y se emplean cada vez más en aquellos casos en los que no hay muestra del presunto padre y sus supuestos hijos son varones. Así, si se cuenta con otro familiar masculino de la línea paterna, su cromosoma Y será idéntico al del padre no disponible y su supuesto hijo varón. Pero en estos casos, hay que tener en consideración que el resultado basado exclusivamente en microsatélites de Y, no excluye como padre a ningún otro varón de esa línea paterna. Por lo tanto, el estudio debe complementarse con marcadores autosómicos en el caso de que sea necesario eliminar esa posibilidad. Pero sobre todo, los polimorfismos de cromosoma Y son importantes en el análisis de muestras en delitos contra la libertad sexual en las que el esperma u otras células del agresor están mezcladas con células femeninas de la víctima.

A pesar de resultar evidente su capacidad analítica, estos marcadores presentan, como hemos dicho, una limitación: todos los individuos de la misma línea paterna compartirán idéntico perfil haplotípico de cromosoma Y por lo que no podrán ser excluidos como autores de un delito si se presenta ese problema. Los polimorfismos de cromosoma Y están siendo utilizados en todos los laboratorios forenses actualmente y han servido para arrojar luz sobre casos criminales importantes en Europa sobre todo relacionados con agresiones sexuales. Como en éste, existe la necesidad para los polimorfismos de cromosoma Y de



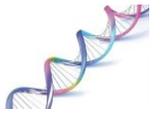
grandes bases de datos poblacionales para estimar la frecuencia de los haplotipos y se ha realizado un esfuerzo colaborativo a nivel mundial muy importante en este sentido.

#### e) **Los polimorfismos de ADN mitocondrial**

Hasta no hace muchos años, el estudio de los polimorfismos de ADN se había centrado mayoritariamente en el análisis de marcadores nucleares. Esto es debido a que, a lo largo de la historia de la genética, la idea de que los genes estaban ubicados en el genoma nuclear ha constituido uno de los pilares fundamentales para el estudio en general de todos los organismos eucariotas. Sin embargo, el modo particular de herencia de algunos genes reveló que estos debían estar situados fuera del núcleo. Durante estos últimos años, el interés por este genoma extranuclear ha crecido considerablemente debido a aquellas peculiaridades que éste presenta respecto al genoma nuclear. Este genoma se encuentra ubicado dentro de las mitocondrias y se conoce como ADN mitocondrial (ADNmt).

El ADNmt se presenta como un marcador con múltiples aplicaciones en el campo de la genética forense debido fundamentalmente a su modo de herencia, su elevada tasa de mutación y a la existencia de miles de moléculas por célula, lo que permite su estudio en condiciones en las que el material biológico a analizar se encuentra en mal estado o en cantidad insuficiente para estudiar cualquier otro marcador nuclear. A diferencia de la mayor parte de los organelos citoplasmáticos, las mitocondrias son lo bastante grandes como para observarse bajo microscopía óptica (0.5  $\mu\text{m}$ -10  $\mu\text{m}$ ). Son orgánulos citoplasmáticos de doble cadena y son las responsables del metabolismo energético celular en las células eucarióticas. El ADN mitocondrial presenta las siguientes características:

- ✓ El ADNmt humano es una molécula ADN circular, cerrado y de doble cadena, lo que le confiere mayor estabilidad (con respecto al genoma nuclear) frente a fenómenos de degradación.
- ✓ El ADNmt mide 16.569 pb y fue secuenciado en su totalidad por primera vez en 1981 por Anderson y cols.



La distribución de las bases difiere en las dos cadenas del ADNmt. Una de las cadenas de la molécula es rica en purinas y es conocida como la cadena pesada o H (heavy). La cadena complementaria es rica en pirimidinas y es conocida como la cadena ligera o L (light)

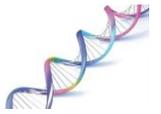
Mientras que el ADNmt significa menos del 1% del ADN celular total, este posee un gran número de copias. Se estima que las células de mamíferos contienen varios miles de copias de ADNmt dependiendo del tipo de tejido. El ADNmt presenta herencia materna y en consecuencia: todos los individuos de un mismo linaje materno exhiben la misma secuencia de ADNmt (exceptuando casos excepcionales en donde exista segregación de heteroplasmías en algún individuo del linaje o evidentemente mutaciones puntuales a nivel germinal).

Los polimorfismos que caracterizan al ADN mitocondrial son sobre todo Polimorfismos de secuencia. En su mayoría, los marcadores genéticos usados en la actualidad en los laboratorios forenses son de origen nuclear. No obstante, existen algunos casos en los que las muestras han sido expuestas a condiciones tan adversas que el estudio del ADN nuclear no es posible. En estos casos, tan solo el ADNmt podrá ser estudiado ya que, debido a sus características, las probabilidades de éxito en la amplificación son muy superiores a la amplificación de marcadores nucleares. Así tenemos como ejemplo los pelos sin bulbo o muestras muy degradadas.

El genoma mitocondrial contiene información de gran utilidad y en ocasiones decisiva judicialmente para el establecimiento de la identidad o fuente de un determinado espécimen biológico, jugando un papel crucial en la identificación criminal.

#### **f) Insertion-deletion**

Se han descrito polimorfismos que consisten en bases insertadas o suprimidas. Las secuencias involucradas son pequeñas, en general de hasta 10 pb, sin embargo, es posible que se presenten secuencias de hasta 1.000 a 1.500 pb, como en el caso de inserción de elementos transponibles o transposones. (*Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013*).



## 6.6. Extracción de ADN

### Tarjetas FTA

Es uno de los métodos más utilizados para la extracción de ADN de sangre y de saliva (células epiteliales). Mediante una lanceta se punza el dedo donador colocando la sangre sobre el papel FTA al contacto éste lisa las membranas celulares de la sangre y desnaturaliza las proteínas, los ácidos nucleicos son inmovilizados, protegidos de los rayos UV, agentes microbianos y hongos. Se almacena por muchos años a temperatura ambiente.



## 6.7. Amplificación de ADN

### 6.7.1. Análisis de polimorfismos de ADN mediante PCR

El análisis de polimorfismos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solucionó muchos problemas y actualmente la mayoría de los vestigios biológicos de interés criminal se analizan utilizando esta técnica.

El descubrimiento de los microsatélites o STR abrió enormes posibilidades a este campo. Sus ventajas eran notables, ya que ofrecían junto a pequeños tamaños (y por lo tanto más resistencia a la degradación), un buen poder de discriminación y facilidades para ser amplificados de forma simultánea con PCR multiplex (esto es amplificar varios sistemas STR simultáneamente a partir de la misma muestra).

### 6.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en una replicación exponencial in vitro de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agoten.



La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados primers u oligonucleótidos, de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR. Los iniciadores deben ser específicos, no formar estructuras secundarias entre ellos ni hibridaciones inespecíficas entre ello u otra parte de la cadena.

### **6.7.3. Amplificación in vitro para la PCR**

La amplificación in vitro para la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación; esto es, se basa en una frecuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5'-3' ya que requiere de un nucleótido 3' libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster.

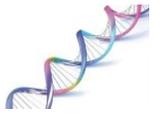
Para que se lleve a cabo la PCR se requiere una cadena de ADNg o ADNc que sirve de molde, una enzima ADN polimerasa, cofactores necesarios para la actividad correcta del ADN polimerasa, desoxinucleótido (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótido o primers.

### **6.7.4. Componentes de la amplificación**

En la actualidad, la Taq ADN polimerasa es la enzima más empleada para la PCR; tiene como función polimerizar una nueva cadena de ADN tomando como molde otra ya existente. Debido a que en cada ciclo de la PCR se lleva la mezcla de reacción a temperatura de 95 °C se requiere de una ADN polimerasa capaz de soportar dichas temperaturas.

#### **a) ADN molde**

Para la PCR teóricamente se requiere de una sola molécula cuya secuencia sirva de molde para la amplificación, ya sea de ADNc o de ADNg. El ADN se puede obtener de cualquier muestra biológica, y la mayoría de técnicas de extracción de ácidos nucleicos provee de moléculas de calidad adecuada para realizar la PCR. Si se requiere amplificar ARN, antes de la PCR se requiere realizar una reacción previa: la retrotranscripción que permite convertir el ARN en ADNc, inestabilidad molecular de ADN es elevada por la presencia de grupo OH en el carbono 2' de la ribosa. El ADNc puede manejarse, entonces, con



mayor facilidad. Las técnicas actuales empleadas en la PCR permiten realizar la amplificación a partir de 300 ng de ADN genómico, o bien desde 25- 100 ng en el caso de ADNc o ADN proveniente de genes clonados en vectores.

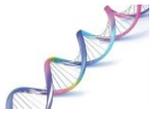
Es importante aclarar que para el kit de Globalfiler Express solamente se necesita un disco de 1.2 mm tomado de la tarjeta FTA con el instrumento Harrys micro punch el cual contiene ADNg que se deposita en un tubo para PCR de 0.2 ml y se le agrega la mezcla de reacción para posterior amplificación por PCR multiplex. En el caso de amplificación de ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de ARN, durante los primeros ciclos de la PCR se realiza la síntesis de la cadena complementaria del ADNc, lo que permitirá la amplificación de la secuencia como ADN de doble cadena (ADNds) en ciclos posteriores de la PCR.

#### **b) Desoxidonucleótidos**

Para que la polimerasa lleve a cabo su función necesita que existan desoxidonucleótidos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de la reacción para poder sintetizar la nueva hebra de ADN. Los desoxidonucleótidos libres, cuando no forman cadenas de ácido nucleótidos, se encuentran, en su forma trifosfatada, estructura molecular necesaria para su estabilidad y proporcionar el grupo fosfato con el que se formara el enlace fosfodiéster en la unión nucleótido. Los desoxidonucleótidos trifosfatados deben adicionarse en concentración óptima de entre 50 y 200  $\mu\text{M}$ , cantidad suficiente para sintetizar de 6.5 a 25  $\mu\text{g}$  de ADN. Cantidades mayores de 200  $\mu\text{M}$  pueden producir en incorporaciones erróneas, mientras sus concentraciones menores de 50  $\mu\text{M}$  se consideran insuficientes para una síntesis adecuada.

#### **c) Amortiguador**

La solución amortiguadora proporciona el pH y concentraciones de sales adecuadas para la correcta función del ADN polimerasa. Este búfer maneja un pH de 8.4 y está compuesto por tris-HCL y KCL.



#### **d) Cloruro de magnesio**

El magnesio actúa como cofactor del ADN polimerasa y se suplementa a una concentración de entre 1.0 y 2.5 mM. Esta concentración debe optimizarse de manera experimental para cada PCR, ya que un exceso de magnesio produce una amplificación inespecífica de productos de PCR, mientras que una baja concentración disminuye la producción de amplificado.

#### **e) Iniciadores**

El diseño adecuado de los iniciadores es la clave del éxito de una PCR. Estos oligonucleótidos con secuencia específica, se utilizan para reconocer por complementariedad secuencias blanco en el ADN molde. En la PCR convencional, se usa un par de iniciadores para delimitar los extremos del producto que se desea amplificar. Su función radica en proporcionar un extremo 3' libre a que se han de añadir los nucleótidos consecutivos mediante enlaces fosfodiéster, ya que el ADN polimerasa requiere iniciar la síntesis partiendo de un 3' OH preexistente. A partir de ello, la ADN polimerasa inicia la polimerización en dirección 5' → 3'. Los iniciadores reciben el nombre de sentido y antisentido, según la secuencia a la que dan origen. El iniciador sentido es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del ADN molde, por lo que la polimerasa al adicionar nucleótido, en el origina una cadena sentido 5'-3'. En cambio, el primer antisentido es complementario y antiparalelo a la cadena a5'-3' por lo que su polimerización originara la cadena 3'-5'. En la PCR la concentración optima de los iniciadores es de 0.3 μM/ reacción, ya que un exceso favorecería la formación de dímeros entre los primers parcialmente complementarios, o bien de estructuras secundarias por complementariedad parcial de primers con el mismo.

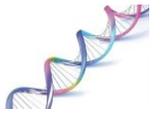
#### **6.7.5. Esquema de la PCR**

El esquema convencional de una PCR incluye los siguientes pasos:

Inicio de la desnaturalización

Ciclos de amplificación.

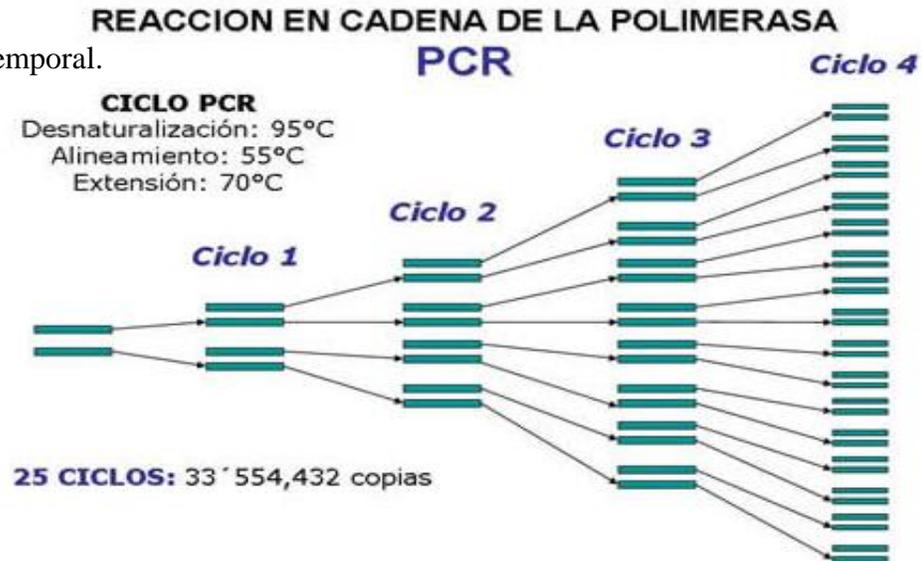
- ✓ Temperatura de la desnaturalización



- ✓ Temperatura de alineamiento
- ✓ Temperatura de extensión

Amplificación final

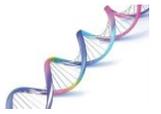
Almacenamiento temporal.



Estos pasos se llevan a cabo mediante el cambio automático de temperatura en un equipo diseñado para este fin denominado termociclador.

### Termociclador

Es el equipo en el cual se realiza la PCR, es capaz de cambiar la temperatura de la muestra en cuestión de segundos, lo que por lo general se logra mediante calentamiento/enfriamiento por resistencia eléctrica de una placa metálica, que disminuye la temperatura mediante tiempos prolongados en el rango de segundos a minuto. Normalmente el rango de temperaturas que abarca el equipo va de 4 a 96 °C. Dado que las PCR que se incuban son soluciones acuosas, los equipos cuentan con una placa metálica a manera de tapa, la cual se mantiene a 103 °C para evitar la condensación de agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción. De esta manera, se evita que la concentración de los solutos se modifique, lo que alteraría las condiciones óptimas para la ADN polimerasa y la termodinámica de la hibridación de los primers. Para el enfriamiento se genera flujos de aires fríos lo que permite descenso de temperatura relativamente rápida.



### ✓ **Equipo para realizar PCR**

ProFlex 96-well PCR System es un termociclador de Applied Biosystems. El sistema ProFlex combina la fiabilidad y el rendimiento de los instrumentos de Applied Biosystems con las características de configuración y control flexibles que se adaptan a las necesidades de investigación.

#### **a) Inicio de la desnaturalización**

Es necesario una temperatura de 95 °C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN, en el caso del ADN genómico, o el rompimiento de estructuras secundaria en ADNc. Esta temperatura se mantiene por cinco minutos al inicio de la PCR.

#### **b) Ciclos de amplificación**

Un ciclo típico de PCR convencional consta de las tres temperaturas siguientes:

95 °C: desnaturalización por 30 segundos

55 a 60 °C: alineación por 30 a 40 segundos.

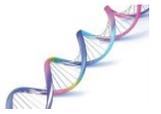
72 °C extensión, según la longitud del producto que se va a amplificar, considerando la adición de 1000 nucleótidos en 60 segundos. Este ciclaje de temperatura se repite continuamente por 30 a 35 ocasiones. Cada temperatura cumple con una función específica.

### ✓ **Desnaturalización**

Se realiza a 95 °C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN y/o destruir las estructuras secundarias del ADN, lo que permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias. Esta temperatura se mantiene por 30 segundos.

### ✓ **Alineación**

En esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55 y 60 °C, en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; esto es, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadena de ADN su secuencia complementaria y forme



los puentes de hidrogeno con la cadena molde, dejando el extremo 3' OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la ADN polimerasa.

✓ **Extensión**

Se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, por lo que dependerá esta para la PCR. En el caso de la Taq polimerasa, la más utilizada es de 72 °C.

**c) Amplificación final**

Una vez terminado los ciclos designados para la PCR, la temperatura de extensión (60 °C) se mantiene por cinco minutos lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.

**d) Almacenamiento temporal**

Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa un ciclo final de 4 °C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retire los tubos de reacción del equipo.

### **6.7.6. Modalidades de la técnica de PCR**

Esta técnica ha evolucionado desde su invención. En la actualidad, gracias a múltiples sistemas de detección, a variantes en los iniciadores y a la cantidad de pares de primers empleadas se dispone de diversas variantes de la técnica; GlobalFiler Express tiene característica de las siguientes PCR.

**a) PCR múltiple (varias regiones o varios genes)**

En ese tipo de PCR se realiza la amplificación de más de un fragmento de ADN en una sola reacción de PCR con dos o más juegos de primers (cada juego para un gen en particular). Tiene la ventaja de que ahorra tiempo y reactivos, pero presenta el inconveniente que diseño de los primers debe ser adecuado para que no se complementen entre ellos. La PCR múltiple puede emplearse para la búsqueda de varias deleciones, mutaciones y polimorfismo en un solo gen o múltiples.



### **b) PCR in situ**

Se realiza en una muestra de tejido embebida en parafina (laminilla) o congelada y cortada en criostato. No requiere de extracción de ADN de tejido. Esta modalidad de PCR permite saber qué tipo celular está presente en un tejido; expresa un determinado gen.

### **c) PCR en tiempo real**

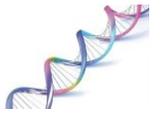
La reacción de amplificación es la misma lo que cambia es el método de detección del producto amplificado y su temporalidad. La detección de las copia de productos del PCR se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación, mediante intercalados en el producto del PCR, un láser que detecta fluorocromos acoplados a los primers o una sonda que hibrida en medio de los primers que se degrada y libera su fluorocromos por la acción exonucleasa 3'-5' de la polimerasa. Mediante la detección de la fluorescencia liberada durante la reacción de amplificación puede medirse la cantidad de ADN sintetizada en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de reacción de amplificación. (*Salazar, Sandoval y Armendáriz, 2013*)

La PCR en tiempo real es un ensayo que monitorea la acumulación del producto de PCR mientras tiene lugar la amplificación. Analiza ciclo a ciclo los cambios en la señal de fluorescencia generados durante las tres fases de la PCR. Entre menos ciclos se requieran para detectar la señal de fluorescencia, mayor será la cantidad de DNA presente.

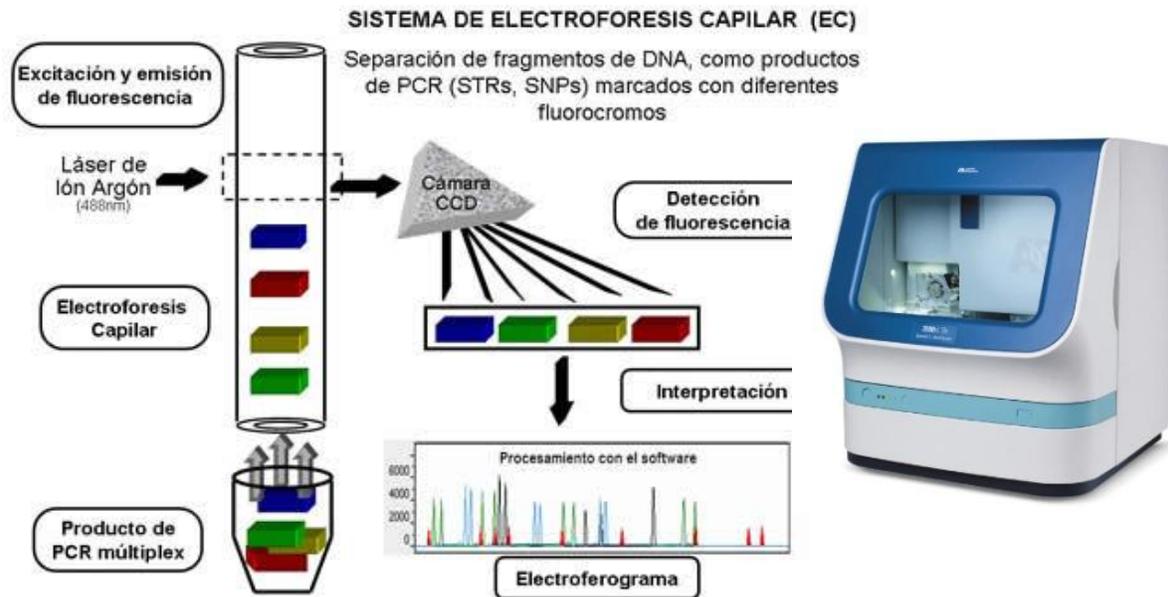
## **6.8. Secuenciación de ADN**

### **6.8.1. Electroforesis capilar**

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se ha desarrollado gracias a los avances de la cromatografía líquida de alta eficacia junto con los procedimientos más tradicionales de electroforesis. Esta técnica permite separar bastante bien biomoléculas, donde la cromatografía líquida se muestra menos eficaz, y compuestos de pequeña masa molecular, difíciles de estudiar por los procedimientos clásicos de electromigración en soporte. La electroforesis capilar constituye una adaptación particular de la técnica de electroforesis. Esta técnica separativa se basa



en la migración de las especies de la muestra en disolución, portadoras de una carga eléctrica global, bajo el efecto de un campo eléctrico y en contacto con un soporte (medio de desplazamiento) adecuado. En el caso de Globalfiler Express se utiliza electroforesis capilar que permite diferenciar por colores los distintos tipos de alelos presentes en las muestras sin que se solapen unos de otros.



En electroforesis capilar la tira se reemplaza por un tubo capilar abierto en sus extremos, fabricado con un diámetro pequeño (15 a 150  $\mu\text{m}$ ). El capilar oscila entre 20 y 80 cm, y está lleno de una solución buffer. Un detector se encuentra ubicado en un extremo del capilar, cerca del compartimiento catódico. La señal obtenida es la base de la obtención del electroferograma, que muestra el registro de la composición de la muestra. Solo las especies que se dirigen hacia el cátodo serán detectadas.

En la detección UV-Vis se mide la intensidad de la luz que pasa a través del capilar en una pequeña zona en la que se ha eliminado el revestimiento opaco. La detección por fluorescencia resulta más sensible si se emplea una fuente láser muy intensa asociada a menudo a un procedimiento de preformación de derivados de los analitos portadores de un fluoróforo. Dentro del capilar de separación se encuentra la disolución que contiene los analitos o las moléculas a separar y el tampón o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. El interior se encuentra formado por grupos silanol (Si-OH), los



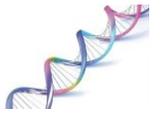
cuales al ser desprotonados (Si-O), elevan considerablemente pH y favorecen la presencia de analitos específicos.

Como se ha dicho, la separación se lleva a cabo según la relación masa/carga de las distintas moléculas. Para que esto sea posible es necesario aplicar una diferencia de potencial (de 100 a 500 V/cm) entre los dos extremos del capilar que hará que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar (movilidad electroforética: las moléculas catiónicas hacia el polo negativo y las aniónicas hacia el polo positivo) y que se vayan separando entre sí.

Además, existe dentro del capilar otro fenómeno denominado flujo electro osmótico que se da debido a que la superficie interna del capilar está cargada. El flujo electro osmótico es el mismo dentro de todo el capilar y afecta de igual forma a todas las moléculas arrastrándolas hacia uno de los extremos. Así, la separación se verá afectada por el flujo electro osmótico y por la movilidad electroforética de cada una de las moléculas. La inducción del alto potencial eléctrico permite: 1) que la separación sea más sensible entre las diferentes moléculas (aumento de la resolución) y 2) que el tiempo de análisis sea más corto.

La eficacia y la velocidad de la separación se pueden mejorar mediante la optimización de diferentes factores como son la temperatura, el voltaje aplicado, el medio de separación, el disolvente en el que se encuentra disuelta la muestra, etc.

Generalmente se obtienen tiempos de análisis bastante bajos si se compara con otras técnicas separativas como la cromatografía de gases o la de líquidos. Además el consumo de muestra y reactivos es muchísimo menor por lo que se la puede considerar una técnica más limpia. Es muy versátil ya que se puede emplear para separar cualquier tipo de compuesto eligiendo bien el detector; se puede acoplar a un detector UV, de fluorescencia, un espectrómetro de masas, etc. Todas estas características convierten a la EC en un método eficiente y económico, capaz de separar cientos de componentes de forma simultánea, empleando cantidades mínimas de muestras y reactivos. (*Morales B. 2008*).



## **6.9. Globalfiler Express PCR kit de amplificación**

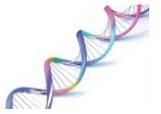
California, 17 de septiembre de 2012, Life Technologies Corporation, el líder mundial en soluciones de identificación humana, lanzó el kit GlobalFiler y GlobalFiler Express, dos nuevos kits de ADN que revolucionaron la forma en que los laboratorios de criminalista realizan las pruebas forenses en todo el mundo, haciendo que el procesamiento de muestras de ADN sea más rápido, más fácil y más barato. Al aumentar el número de marcadores genéticos en más de 30% a 24 loci, GlobalFiler Express ofrece la capacidad de recuperar una cantidad considerablemente mayor de información de las muestras forenses y aumenta el poder de discriminación en hasta 9 órdenes de magnitud.

Esto da como resultado comparaciones más rápidas y poderosas de los datos forenses para resolver crímenes. Este gran avance, combinado con una eficiencia de procesamiento cinco veces más veloz, permitirá a los forenses resolver y evitar más crímenes, y enfrentar los siempre crecientes retrasos. Hasta la fecha, 44 países han implementado ya programas de bases de datos de ADN de criminales con un fondo combinado de muestras de delincuentes de 40 millones, y en aumento.

### **A. Descripción del producto**

Este kit es un ensayo multiplex de 6 tinte, repeticiones cortas en tándem (STR) optimizado para permitir la amplificación directa de los siguientes tipos de muestras: sangre, saliva, semen, pelos, de una sola fuente. El kit GlobalFiler Express, amplifica 21 loci STR autosómicos (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338) y el marcador determinante del sexo, Amelogenina, un Y STR locus, DYS391, y un locus Y inserción / deleción (Y inDel) locus en una sola reacción de PCR (24 loci total).

El kit contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación de ADN genómico humano. Los reactivos están diseñados para su uso con los siguientes instrumentos y software:



- ✓ Termociclador: GeneAmp PCR System 9700, de 96 pocillos. (ProFlex).
- ✓ Un Genetic Analyzer ABI 3500XL.
- ✓ Un Software GenMapperID ID-X v1.4

## 6.10. Valoración estadística en genética forense

### a) Cálculo de frecuencias alélicas

Se analizan los datos observados en el estudio poblacional y se realiza el cálculo mediante:

$$p_i = \frac{x_i}{n}$$

Pi= frecuencia del alelo i

Xi= número de alelos i en la base de datos

n= número total de alelos en la base de datos

El Forensic Science Service (FSS):

$$p_i = \frac{x_i+4}{n+4} \text{ En el caso de homocigotos}$$

$$p_i = \frac{x_i+2}{n+2} \text{ Y } p_j = \frac{x_j+2}{n+2} \text{ en el caso de heterocigotos}$$

### b) Cálculo de frecuencias alélicas mínimas

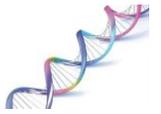
Determinados marcadores genéticos, altamente polimórficos, pueden poseer un elevado número de alelos, y alguno de ellos puede presentarse con una frecuencia muy baja en la población objeto de estudio.

$$\text{Polimorfismos VNTRs/ SRTs ----- } P_{min} = 1 - \alpha^{\frac{1}{2n}}$$

Siendo:

$\alpha$ : nivel de significación (0'05)

n: tamaño muestral



### c) Equilibrio de Hardy Weinberg

Los alelos de un locus muestran correlación no a priori con cada otro locus. El equilibrio de Hardy Weinberg ocurre en una población que se mezcla al azar y no ocurren las fuerzas de migración, deriva génica o selección en una población infinita; el resultado es un locus en equilibrio donde las frecuencias alélicas no cambian de generación en generación, las frecuencias genotípicas se mantienen constantes, la suma de las frecuencias genotípicas de un locus y de los alelos siempre debe ser uno.

### d) Asociación entre los loci objeto de estudio

La mayoría de los loci objeto de estudio en genética forense se encuentran en cromosomas diferentes por lo que es factible suponer que no habrá asociaciones entre ellos, es decir, la probabilidad de tener un determinado alelo en un locus no está condicionada por la probabilidad de poseer cualquier otro alelo en cualquier otro locus estudiado.

### e) Parámetros estadísticos más importantes utilizados en genética forense

#### ✓ Probabilidad de exclusión a priori

Un método común para cuantificar la validez de un sistema genético es calcular la probabilidad de exclusión a priori (PE). Esta probabilidad se define como la probabilidad de que un sistema genético específico dará evidencias que conducirán a la exclusión de un sospechoso.

En los sistemas genéticos codominantes de dos alelos, la probabilidad de exclusión a priori.  $PE = pq(1-pq)$

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

#### ✓ Probabilidad de no discriminación

Es la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar tengan idénticos genotipos en un sistema dado o en una serie de sistemas genéticos.

La probabilidad de no discriminación puede simplificarse a:

$$P = \sum_{i=1}^n P_i^2$$



Siendo  $P_i$  la frecuencia del fenotipo  $i$ .

Si un sistema genético tiene  $k$  alelos de igual frecuencia, entonces la probabilidad de no discriminación mínima es  $(2k-1)/k^3$ . Este valor sigue siendo la probabilidad de no discriminación mínima en sistema con dominancia.

#### ✓ Poder de discriminación

Este parámetro estadístico se define como la probabilidad de que los individuos no relacionados y tomados al azar pueden ser diferenciados genéticamente mediante el análisis de un marcador o conjunto de marcadores genéticos. El poder de discriminación (PD) se calcula de la siguiente manera:

$PD = 1 - \text{Probabilidad de no discriminación.}$

#### ✓ Heterocigosidad

La variabilidad genética de una población, se mide como heterocigosidad media por locus. Esta es la mejor estima de la variabilidad de una población si el estudio se realiza sobre un número elevado de loci escogidos al azar, ese número de loci existirían unos caracteres monomórficos y otros polimórficos con alta y baja frecuencia de los alelos raros, al igual que el genoma.

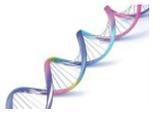
La heterocigosidad observada (para un locus) se define como el número de individuos de heterocigoto observados respecto al total analizado, mientras que la heterocigosidad esperada es la proporción de heterocigoto esperada si la población se encontrara en equilibrio Hardy-Weinberg:

$$H_e = 1 - \sum_i^m P_i^2$$

Siendo  $P_i$  la frecuencia genética del alelo  $i$  en un locus de  $n$  alelos.

#### ✓ Probabilidad de concordancia

La probabilidad de concordancia es la probabilidad de un individuo seleccionado al azar coincida con una serie dada de genotipos. Si se representa la probabilidad de concordancia, entonces para  $n$  sistema genético:



$$C = p_1 \cdot p_2 \cdot \dots \cdot p_n$$

Donde  $P_j$  es la frecuencia del genotipo  $j$

La probabilidad de concordancia se refiere a un solo individuo y a un solo genotipo dentro de un sistema genético.

#### f) Utilización de $F_{ST}$

##### ✓ Estimación de frecuencias de perfiles de ADN

Tras realizar una analítica de identificación mediante polimorfismos de ADN, nos podemos encontrar con una situación de coincidencia entre perfil de ADN, se ha demostrado, que en modelos reales de heterogeneidad poblacional, el uso de la regla del producto para calcular frecuencias de perfiles de ADN.

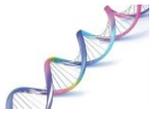
Las formulas a utilizar para el cálculo de las frecuencias genotípicas esperadas en un loci bajo equilibrio de Hardy-Weinberg son las siguientes:

$$P_{ii} = p_i^2 + p_i (1 - p_i) F_{ST}$$

$$P_{ij} = 2p_i p_j (1 - F_{ST}), I$$

Se recomienda utilizar un valor de  $F_{ST} = 0.03$  [47], aunque dicho valor es demasiado conservador ya que un valor realístico puede oscilar entre 0.001 y 0.005. Es más, al estimar la frecuencia de un perfil genético mediante el uso de  $F_{ST}$ , se obtiene un incremento de la frecuencia de los heterocigotos y una disminución de los homocigotos. Así al calcular la frecuencia de un perfil genético a través de varios loci el efecto total de endogamia tenderá a ser cero.





## VII. DISEÑO METODOLÓGICO

**Tipo de estudio:** El presente estudio es descriptivo retrospectivo de corte transversal. Se analizó la información contenida en archivos del laboratorio de genética forense correspondiente a pruebas de paternidad realizadas en el periodo Agosto- Noviembre 2016.

**Área de estudio:** Laboratorio de ADN, del instituto de Medicina Legal (IML), ubicado del Ministerio del Trabajo 1 cuadra al sur, Managua, Nicaragua.

**Universo:** 750 personas que acudieron a realizarse pruebas de ADN.

**Muestra:** La conformaron 500 personas provenientes de 15 departamentos y dos regiones autónomas de la costa Caribe norte y sur. Lo que representa el 0.008 % de la población nicaragüense (6, 152,000).

**Tipo de muestreo:** probabilístico. (Ver cálculos en anexos).

Para la selección de la muestra se tomaron en cuenta los siguientes criterios.

### **Criterios de inclusión:**

1. Que la detección de ADN fuese realizada con la técnica GlobalFiler Express.
2. Que los perfiles genéticos a estudiar fuesen de mujeres y hombres que no tengan parentesco, de las muestras de paternidad realizadas por el laboratorio de ADN.

### **Criterios de exclusión**

1. Se excluyeron los alelos de los hijos ya que estos tienen una copia del genoma de sus padres.
2. Se excluyó el marcador sexual Amelogenina ya que este marcador no se encuentra dentro de la clasificación de marcadores microsatélites.



## **Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información**

Los datos de las personas analizadas se recolectaron en formularios (ver en anexos) que contenían la información de edad, sexo, departamento de procedencia y una tabla de resultados para la prueba, a cada formulario se le estableció un número. Para el presente estudio solamente se tuvo acceso al número de paternidad y los perfiles obtenidos de las madres y los presuntos padres y no a los datos como nombres, direcciones o resultado estadístico final del análisis de ADN, se elaboró una base de datos en Access que contenían los 500 perfiles genéticos utilizados en el estudio.

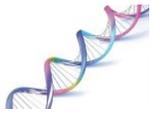
### **Procedimiento para la recolección de la información.**

El Laboratorio de ADN realizó la detección de ADN nuclear usando 21 marcadores microsatélites: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33; marcadores altamente sensibles debido a su elevado grado de polimorfismo importantes en la identificación genética de individuos.

El ADN se extrajo de muestras de sangre depositadas en tarjetas de FTA, estas contienen productos químicos que lisan las células, desnaturalizan las proteínas y protegen los ácidos nucleicos de las nucleasas, la oxidación y los daños causados por radiación UV. Estas tarjetas inactivan rápidamente organismos, como los patógenos de transmisión hemática, e impiden el crecimiento de bacterias y otros microorganismos.

Para la amplificación de la PCR utilizaron el ProFlex 96-Well PCR System, el sistema de PCR ProFlex es un ciclador térmico diseñado específicamente para la amplificación de ácidos nucleicos utilizando el procedimiento de reacción en cadena de polimerasa (PCR). La interfaz de usuario consiste en una pantalla táctil con una pantalla gráfica que muestra la hora, el estado, y la temperatura para cada ejecución.

La electroforesis capilar la realizaron con el equipo Genetic Analyzer ABI 3500XL, éste analizador genético establece el estándar en la electroforesis capilar. Los instrumentos de la



serie 3500 son los primeros analizadores genéticos diseñados con un conjunto de características específicas y flujo de trabajo para la aplicación Identificación Humana.

El producto completo combina el instrumento con reactivos de Applied Biosystems, consumibles y software, así como el apoyo principal de la industria, para proporcionar una solución de sistema HID integrado que mejora significativamente la facilidad de uso y eficiencia de la aplicación. Las denominaciones de alelos se hicieron de acuerdo a las recomendaciones de la comisión de ADN de los ISFG con ayuda de ladder alélicas proporcionada por el fabricante.

### **Procesamiento y análisis de los resultados**

El análisis de los resultados se procesó con los programas de Word para levantado de texto, Excel para entrada y salida de gráficos y tablas, Power Point para realizar la presentación.

Se analizaron los datos estadísticamente con el paquete de software de análisis de datos PowerStats el cual arroja los datos para encontrar las frecuencias alélicas, poder de exclusión, poder de discriminación, el porcentaje de homocigotos y heterocigotos de la población nicaragüense.

En la electroforesis capilar, la fluorescencia es colectada por el instrumento y el software data collection y guardada como un archivo de datos crudos. Este archivo es posteriormente transferido al software GenMapperID para la asignación de tamaño y genotipificación.

El Software GenMapperID es una solución de análisis de datos que significativamente ayuda a racionalizar el flujo del análisis de las muestras forenses. Una solución completa para aquellos laboratorios que están buscando implementar un sistema experto y aplicar una herramienta más eficiente para el análisis tradicional de datos. Agrupa los algoritmos del software aplicados a los datos durante el análisis, detección de Picos y Sizing, asignación de alelos y filtro, determinación de la calidad.



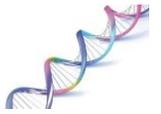
### **Consideraciones éticas**

La información fue manejada solamente por el grupo de investigación y por el Laboratorio de ADN. Los datos del estudio fueron utilizados exclusivamente para fines del mismo. No se necesitó un consentimiento firmado de parte de las personas incluidas en el estudio ya que no se tuvo acceso a datos personales, ni resultados finales de las pruebas de parentesco. El estudio fue autorizado por el instituto politécnico de la salud y coordinado por el Instituto de Medicina Legal.

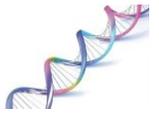


### VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Subvariable	Indicador	Valor	Criterio
Alelos	Marcadores microsatélites	D3S1358	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Presente-ausente
		vWA	11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	Presente-ausente
		D16S539	5, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15	Presente-ausente
		CSF1PO	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	Presente-ausente
		TPOX	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	Presente-ausente
		D8S1179	5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	Presente-ausente
		D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	Presente-ausente
		D18S51	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	Presente-ausente
		D2S441	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17	Presente-ausente
		D19S433	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2, 19.2	Presente-ausente
		TH01	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	Presente-ausente
		FGA	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	Presente-ausente
		D22S1045	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	Presente-ausente
		D5S818	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	Presente-ausente
		D13S317	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Presente-ausente
D7S820	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	Presente-ausente		



		SE33	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37	Presente-ausente
		D10S1248	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	Presente-ausente
		D1S1656	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3	Presente-ausente
		D12S391	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	Presente-ausente
		D2S1338	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	Presente-ausente
Parámetros forenses		Poder de Discriminación	Menor o igual a 1	- - -
		Probabilidad de coincidencia	Menor o igual a 1	- - -
Variabilidad genética		Heterocigocidad	1-100%	- - -
		Homocigosidad	1-100%	- - -



## IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

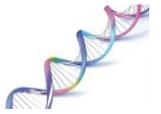
En este estudio, los análisis de las frecuencias alélicas fueron calculadas con el propósito de inferir el grado de polimorfismo de los microsatélites, caracterizando la variabilidad genética de la población nicaragüense. Se analizaron 500 perfiles genéticos de mujeres y hombres que acudieron a realizarse pruebas de ADN en el laboratorio de Genética Forense 9 del Instituto de Medicina Legal, Octubre-Noviembre 2016. Se estudió la frecuencia de 21 marcadores microsatélites: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, SE33.

Se determinó probabilidad de coincidencia y poder de discriminación para resolución de casos forenses y porcentajes de heterocigotos y homocigotos para evaluar la variación genética en la población nicaragüense.

**Tabla 1. Frecuencias alélicas de los locus TH01, CSF1PO Y D7S820 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	TH01	CSF1PO	D7S820
6	0.37	0.001	0
7	0.219	0.012	0.011
8	0.116	0.007	0.11
9	0.098	0.016	0.053
9.1	0	0	0.001
9.3	0.191	0	0
10	0.006	0.26	0.258
10.3		0.001	0.003
11		0.275	0.28
11.3		0	0.002
12		0.377	0.227
13		0.047	0.049
14		0.003	0.006
15		0.001	0

Fuente: Programa estadístico PowerStats



Estos marcadores pertenecen a la clasificación de marcadores de repetición cortas en tandém (RCT) de baja microvariación. Los distintos alelos que conforman estos locus comparten una estructura consenso en la que las principales diferencias se deben al número de copias de la unidad repetitiva.

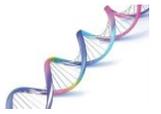
El marcador TH01 esta localizado en el brazo corto del cromosoma 11, banda 1, sub banda 5, sub-sub-banda 5 (11p15.5), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (TCAT)<sub>n</sub>. El marcador TH01 es un locus de repetición corta en tandém tetramérico, localizado en el intrón 01 del gen de la tirosina hidroxilasa humana con una secuencia repetitiva 5'-3'AATG. Los alelos mas frecuentes para este locus en la población nicaraguense son los alelos 6 y 7 con una frecuencia de 0.37 y 0.219 respectivamente.

El marcador CSF1PO esta localizado en el brazo largo del cromosoma 5, banda 3, sub banda 3, sub-sub-banda 1 (5q33.1), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (AGAT)<sub>n</sub>. El locus CSF1PO es un protooncogen humano c-fms para el gen del receptor CSF-1, con una frecuencia repetitiva 5'-3' AGAT y una localización cromosómica 5q33.3-34. Este marcador muestra en la población nicaraguense una frecuencia alélica mayor en los alelos 10, 11 y 12, con una frecuencia de 0.26, 0.275 y 0.377 respectivamente. El marcador D7S820 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 7, banda 2, sub-banda 1, sub-sub-banda 1, sub-sub-sub-banda 1 (7q21.11), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (GATA)<sub>n</sub>. El marcador D7S820 tiene una frecuencia alélica en Nicaragua mayor en los alelos 10 (0.258), 11(0.28) y 12 (0.227).

**Tabla 2. Frecuencias alélicas de los locus D5S818, D3S317 y TPOX en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Frecuencias D5S818</b>	0	0.046	0.011	0.096	0.042	<b>0.409</b>	<b>0.28</b>	0.112	0.004	0
<b>Frecuencias D13S317</b>	0	0	0.076	<b>0.191</b>	0.085	<b>0.197</b>	<b>0.249</b>	0.108	0.091	0.003
<b>Frecuencias TPOX</b>	0.013	0.004	<b>0.47</b>	0.065	0.038	<b>0.296</b>	0.111	0.001	0.002	0

**Fuente: Programa estadístico PowerStats.**



El marcador D13S317 está localizado en el brazo largo del cromosoma 13, banda 3, sub-banda 1, sub-sub-banda 1 (13q31.1), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (TATC) n. El marcador TPOX está localizado en el brazo corto del cromosoma 2, banda 2, sub-banda 5, sub-sub-banda 3 (2p25.3), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (AATG) n. El marcador D5S818 está localizado en el brazo largo del cromosoma 8, banda 2, sub-banda 3, sub-sub-banda 2 (5q23.2), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (AGAT) n.

Estos marcadores están formados por unidades de repetición idénticas, tanto en longitud como en secuencia. En estos sistemas no existen alelos intermedios (alelos con unidades de repetición incompleta) por eso son clasificados como repeticiones cortas en tandém (RCT) simples.

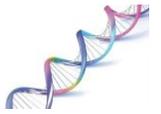
Los alelos de mayor frecuencia en el locus D5S818 son los alelos 11 (0.409) y el alelo 12 (0.28). Las frecuencias alélicas del locus D13S317 observadas en la tabla nos indican que los alelos de mayor frecuencia en la población nicaraguense son los alelos 9 con una frecuencia de 0.191, el alelo 11 con una frecuencia de 0.197 y el alelo 12 con una frecuencia de 0.249. El marcador TPOX gen de la peroxidasa tiroidea humana, presenta frecuencias mayores en los alelos 8 con una frecuencia de 0.470 y el alelo 11 con una frecuencia de 0.296.

**Tabla 3. Frecuencias alélicas del locus VWA y D3S1358 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>Frecuencias vWA</b>	0.001	0	0.004	0.057	0.103	<b>0.382</b>	<b>0.281</b>	<b>0.122</b>	0.045	0.005
<b>Frecuencias D3S1358</b>	0	0.002	0.003	0.079	<b>0.448</b>	<b>0.251</b>	<b>0.127</b>	0.085	0.005	0

**Fuente: Programa estadístico PowerStats.**

Estos marcadores pertenecen a la clasificación de marcadores de repetición cortas en tandém (RCT) de microvariación intermedia. El marcador D3S1358 esta localizado en el



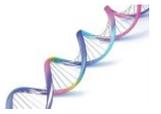
brazo corto del cromosoma 3, banda 2, sub-banda 1, sub-sub-banda 3, sub-sub-sub-banda 1 (3p21.31), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (TCTA)<sub>n</sub> y (TCTG)<sub>n</sub>. El marcador vWA esta localizado en el brazo corto del cromosoma 12, banda 1, sub-banda 3, sub-sub-banda 3, sub-sub-sub-banda 1 (12p13.31), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (TCTA)<sub>n</sub> y (TCTG)<sub>n</sub>.

Los alelos de mayor frecuencia para el marcador vWA (gen del factor von Willebrand humano) son los alelos 16 con una frecuencia de 0.382, alelo 17 con una frecuencia de 0.281 y el alelo 18 con una frecuencia de 0.122. Los alelos de mayor frecuencia para el locus D3S1358 son el Alelo 15 con una frecuencia de 0.448, el alelo 16 con una frecuencia de 0.251 y alelo 17 con una frecuencia de 0.127.

**Tabla 4. Frecuencia alélica del locus D18S51 en la población de Nicaragua, Octubre- Noviembre 2016.**

Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
<b>10</b>	0.004	<b>17</b>	<b>0.15</b>
<b>10.2</b>	0.001	<b>18</b>	0.076
<b>11</b>	0.006	<b>19</b>	0.04
<b>12</b>	0.084	<b>20</b>	0.029
<b>12.2</b>	0.002	<b>21</b>	0.011
<b>13</b>	0.11	<b>22</b>	0.025
<b>13.2</b>	0.001	<b>23</b>	0.009
<b>14</b>	<b>0.215</b>	<b>24</b>	0.002
<b>14.2</b>	0.001	<b>25</b>	0.001
<b>15</b>	<b>0.129</b>	<b>26</b>	0.001
<b>15.2</b>	0.01	<b>27</b>	0.001
<b>16</b>	0.101		

**Fuente: Programa estadístico PowerStats.**



El marcador D18S51 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 18, banda 2, sub-banda 1, sub-sub-banda 3 y sub-sub-sub-banda 3 (18q21.33), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (AGAA)<sub>n</sub>. En estatabla se observa que los alelos de mayor frecuencia son el alelo 14 con una frecuencia de 0.215, alelo 15 con una frecuencia de 0.129 y el alelo 17 con una frecuencia de 0.15.

**Tabla 5. Frecuencia alelica del locus D16S539 en la población de Nicaragua, Octubre- Noviembre 2016.**

Alelos	8	9	10	11	12	13	14
<b>Frecuencias D16S539</b>	0.023	0.134	<b>0.211</b>	<b>0.288</b>	<b>0.225</b>	0.099	0.02

**Fuente: Programa estadístico PowerStats.**

El marcador D16S539 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 16, banda 2, sub-banda 4 y sub-sub-banda 1, (16q24.1), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (GATA)<sub>n</sub>. Los alelos mas frecuentes para el locus D16S539 son 10 (0.211), 11 (0.288) y 12 (0.225).

**Tabla 6. Frecuencia alélica del locus D8S1179 en la población de Nicaragua, Octubre- Noviembre 2016.**

Alelos	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<b>Frecuencias</b>	0.006	0.002	0.08	0.042	0.11	<b>0.325</b>	<b>0.27</b>	0.135	0.026	0.004

**Fuente: Programa estadístico PowerStats.**

El marcador D8S1179 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 8, banda 2, sub-banda 4, sub-sub-banda 1 y sub-sub-sub-banda 3 (8q24.13) y presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (TCTA)<sub>n</sub> y (TCTG)<sub>n</sub>. En esta tabla se muestran las frecuencias alelicas del locus D8S1179, donde se observa que los de mayor frecuencia fueron los alelos 13 (0.325) y 14 (0.27).

**Tabla 7. Frecuencia alélica del locus FGA en la población de Nicaragua, Octubre- Noviembre 2016.**



Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
18	0.005	23.2	0.001
18.2	0.002	24	0.198
19	0.09	25	0.141
19.2	0.001	26	0.112
20	0.063	27	0.029
21	0.112	28	0.008
21.2	0.001	29	0.001
22	0.093	30	0.001
22.2	0.004	31.2	0.001
23	0.127		

Fuente: Programa estadístico PowerStats.

El locus FGA es un marcador perteneciente a la clasificación de marcadores STRs complejos de alta microvariación localizado el tercer intrón del gen alfa fibrina humano y presenta una gran variabilidad tanto en longitud como en la estructura de secuencia. El marcador FGA está localizado en el brazo largo del cromosoma 4, banda 3, sub-banda 1 y sub-sub-banda 3 (4q31.3), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (CTTT) n y (TTCC) n.

En la tabla 7 se observa que los alelos de mayor frecuencia para este marcador son los alelos, 21 (0.112), 23 (0.127), 24 (0.198), 25 (0.141) y 26 (0.112).

**Tabla 8. Frecuencias alélicas del locus D21S11 en la población de Nicaragua, Octubre- Noviembre 2016.**



Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
24.2	0.002	31.2	0.13
26	0.002	32	0.023
27	0.013	32.2	0.128
28	0.078	33	0.003
29	0.219	33.1	0.001
29.3	0.001	33.2	0.04
30	0.266	34.1	0.001
30.2	0.031	34.2	0.003
31	0.058		

**Fuente:** Programa estadístico PowerStats.

El marcador microsatélite D21S11 se encuentra dentro de la clasificación de los marcadores RCT complejos y de alta microvariación, ya que posee varios bloques de unidades de repetición, con longitudes variables. El marcador D21S11 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 21, banda 2, sub-banda 1 y sub-sub-banda 1 (21q21.1), presenta repeticiones de bases tetranucleótidas (TCTA)<sub>n</sub> y (TCTG)<sub>n</sub>. Este marcador posee numerosos alelos intermedios y sustituciones simples de bases de algunas de las unidades.

Los alelos que poseen mayor frecuencia alélica para este locus son 29,30 y 31.2

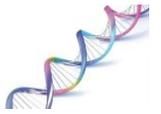


**Tabla 9. Frecuencias alélicas de los locus D2S441, D22S1045 y D10S1248 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	Frecuencias D2S441	Frecuencias D22S1045	Frecuencias D10S1248
8	0	0	0.001
9	0.004	0	0.002
10	<b>0.424</b>	0.009	0.001
11	<b>0.273</b>	0.065	0.008
11.3	0.022	0	0
12	0.039	0.009	0.047
12.3	0.002	0	0
13	0.017	0.002	<b>0.273</b>
14	<b>0.187</b>	0.016	<b>0.38</b>
15	0.032	<b>0.396</b>	<b>0.184</b>
16	0	<b>0.403</b>	0.078
17	0	0.087	0.022
18	0	0.012	0.004
19	0	0.001	0

**Fuente: Programa estadístico PowerStats.**

El locus tetrámico D2S441 altamente polimórfico, esta localizado en el brazo corto del cromosoma 2, banda 1, sub-banda 4, (2p14), siendo los alelos mas frecuentes 10, 11 y 14. El Locus D22S1045 se encuentra ubicado en el brazo largo del Cromosoma 22, banda 1, sub-banda 2 y sub-sub-banda 3 (22q12.3), Los alelos mas frecuentes para este marcador fueron los alelos 15 y 16. Este marcador tiene repetición GGAA. El Locus D10S1248 se encuentra ubicado en el brazo largo del Cromosoma 10, banda 2, sub-banda 6 y sub-sub-banda 3 (10q26.3). Los alelos mas frecuentes para el marcador D10S1248 fueron 13, 14 y 15.

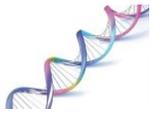


**Tabla 10. Frecuencia alélicas del locus D1S1656 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
<b>10</b>	0.003	<b>16</b>	<b>0.209</b>
<b>11</b>	0.018	<b>16.3</b>	0.063
<b>12</b>	0.067	<b>17</b>	0.069
<b>13</b>	0.084	<b>17.3</b>	<b>0.117</b>
<b>14</b>	0.112	<b>18</b>	0.009
<b>14.3</b>	0.005	<b>18.3</b>	0.039
<b>15</b>	<b>0.182</b>	<b>19.3</b>	0.005
<b>15.3</b>	0.017	<b>20.3</b>	0.001

**Fuente:** Programa estadístico PowerStats.

El locus D1S1656 está localizado en el brazo largo del cromosoma 1, banda 4, sub-banda 2 y sub-sub-banda 2 (1q42.2) es un STR altamente polimórfico con una estructura relativamente simple que es poco común ya que los STRs altamente polimórficos son generalmente complejos en la estructura. Los alelos más frecuentes para este marcador son 15,16 y 17.3.



**Tabla 11. Frecuencia alélicas del locus D12S391 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
15	0.029	19.3	0.006
16	0.032	20	0.188
17	0.095	21	0.068
17.3	0.004	22	0.062
18	0.215	23	0.032
18.3	0.017	24	0.014
19	0.219	25	0.008
19.1	0.001		

**Fuente:** Programa estadístico PowerStats.

El nuevo locus D12S391 se localiza en el brazo corto del cromosoma 12, banda 1, sub-banda 3 y sub-sub-banda 2 (12p13.2) y es de sólo 6,3 megabases, es considerado como un marcador adicional para mejorar el análisis de parentesco complejo. En la población nicaragüense los alelos más frecuentes para este locus corresponden al alelo 18, 19 y 20.

**Tabla 12. Frecuencia alélicas del locus D2S1338 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

Alelos	15	16	17	18	19	20	21
Frecuencias	0.002	0.026	0.12	0.051	0.188	0.146	0.026

Alelos	22	23	24	25	26	27
Frecuencias	0.079	0.214	0.086	0.047	0.014	0.001

**Fuente:** Programa estadístico PowerStats.

El marcador D2S1338 de repetición corta en tándem (STR), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas, este marcador está localizado en el brazo largo del cromosoma 2, banda

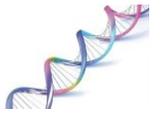


3, sub-banda 5 (2q35). En la población de Nicaragua los alelos más frecuentes son el 19, 20 y 23.

**Tabla 13. Frecuencia alélicas del locus SE33 en la población de Nicaragua, Octubre- Noviembre 2016.**

Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
6.3	0.002	22.2	0.007
10.2	0.001	23	0.001
11	0.001	23.2	0.024
12	0.001	24.2	0.015
12.2	0.001	25	0.001
13	0.004	25.2	0.049
13.2	0.002	26	0.003
14	0.029	26.2	0.07
14.2	0.003	27	0.001
15	0.04	27.2	0.087
16	0.055	28.2	0.085
16.2	0.001	29.2	0.067
17	0.077	30.2	0.039
18	<b>0.113</b>	31.2	0.029
19	0.089	32.2	0.011
20	0.039	33	0.002
20.2	0.001	33.2	0.006
21	0.03	34	0.011
21.2	0.001	34.2	0.004
22	0.007		

Fuente: Programa estadístico PowerStats.



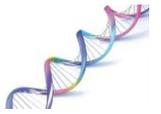
El STR locus SE33, situado en el brazo largo del cromosoma 6, banda 1, sub banda 4 (6q14) es uno de los marcadores más polimórficos utilizados en la identificación humana. Sin embargo, también posee una mayor tasa de mutación que otros loci STR que resulta en múltiples microvariantes tanto dentro de la repetición como en las regiones flanqueantes. El alelo que posee mayor frecuencia para este locus es el alelo 18 (0.113)

**Tabla 14. Frecuencias alélicas del locus D19S433 en la población de Nicaragua, Octubre-Noviembre 2016.**

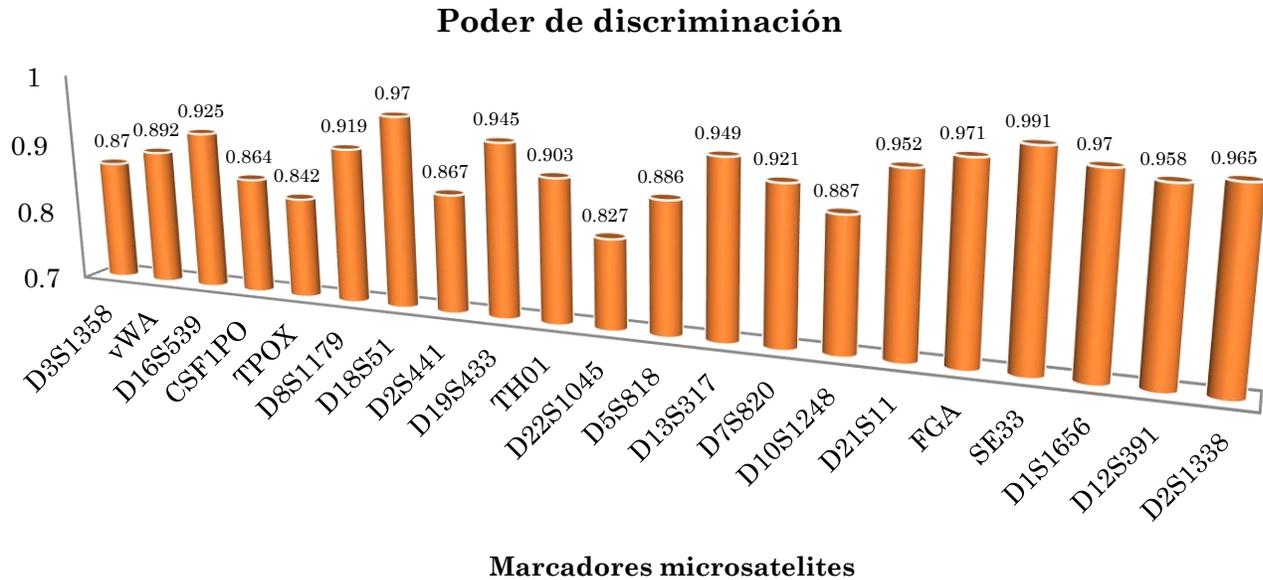
Alelos	Frecuencias	Alelos	Frecuencias
11	0.009	14.3	0.001
11.2	0.008	15	0.138
12	0.085	15.2	0.049
12.2	0.016	16	0.035
13	0.258	16.2	0.004
13.2	0.096	17	0.001
14	0.267	18	0.001
14.2	0.032		

**Fuente:**Programa estadístico PowerStats.

El locus D19S433 es altamente polimórfico, esta localizado en el brazo largo del cromosoma 19, banda 1, sub-banda 2 (19q12). Los alelos mas frecuentes para este locus son los alelos 13, 14 y 15.

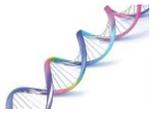


**Grafico 1. Poder de discriminación de la población nicaragüense utilizando marcadores microsatélites, Octubre-Noviembre 2016.**



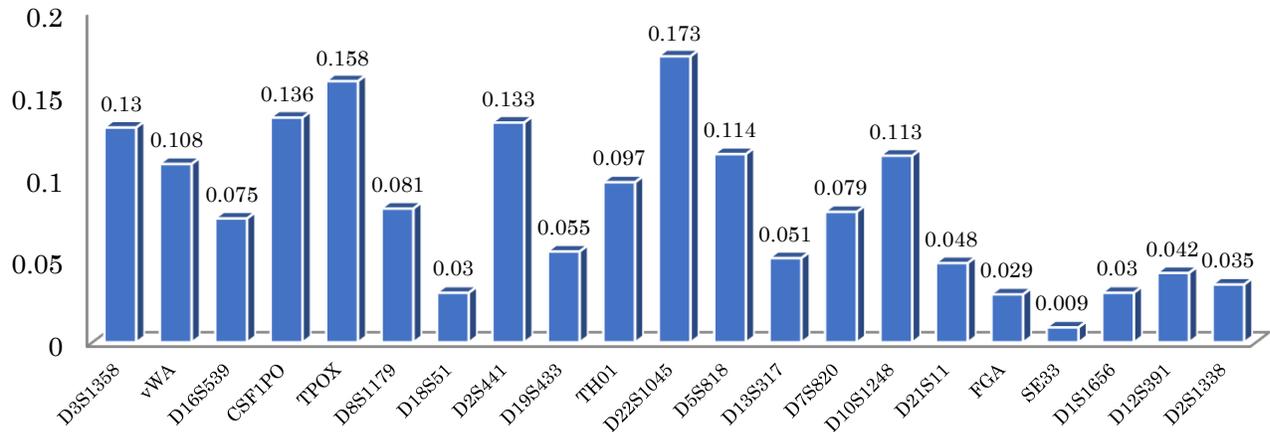
**Fuente: Tabla 15.**

En este gráfico se presentan los datos del poder de discriminación individual para cada locus. El poder de discriminación combinado fue > 99.99999999%. Los marcadores que presentan mayor poder de discriminación fueron: SE33: 0.991, FGA: 0.971, D18S51: 0.970, D1S1656: 0.970, D2S1338: 0.965, D12S391: 0.958. Estos datos indican que existe una alta probabilidad de que 2 individuos no relacionados, de la misma población y tomados al azar puedan ser diferenciados genéticamente por estos marcadores. Esto se debe a que estos marcadores pertenecen a la clasificación marcadores microsatélites complejos y de alta microvariación; que contienen un gran grado de variabilidad debido a sus numerosos alelos intermedios y sustituciones simples de bases en algunas unidades.



**Grafico 2. Probabilidad de coincidencia de la población nicaragüense utilizando marcadores microsatélites, Octubre-Noviembre 2016.**

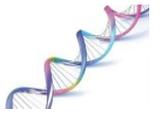
**Probabilidad de coincidencia.**



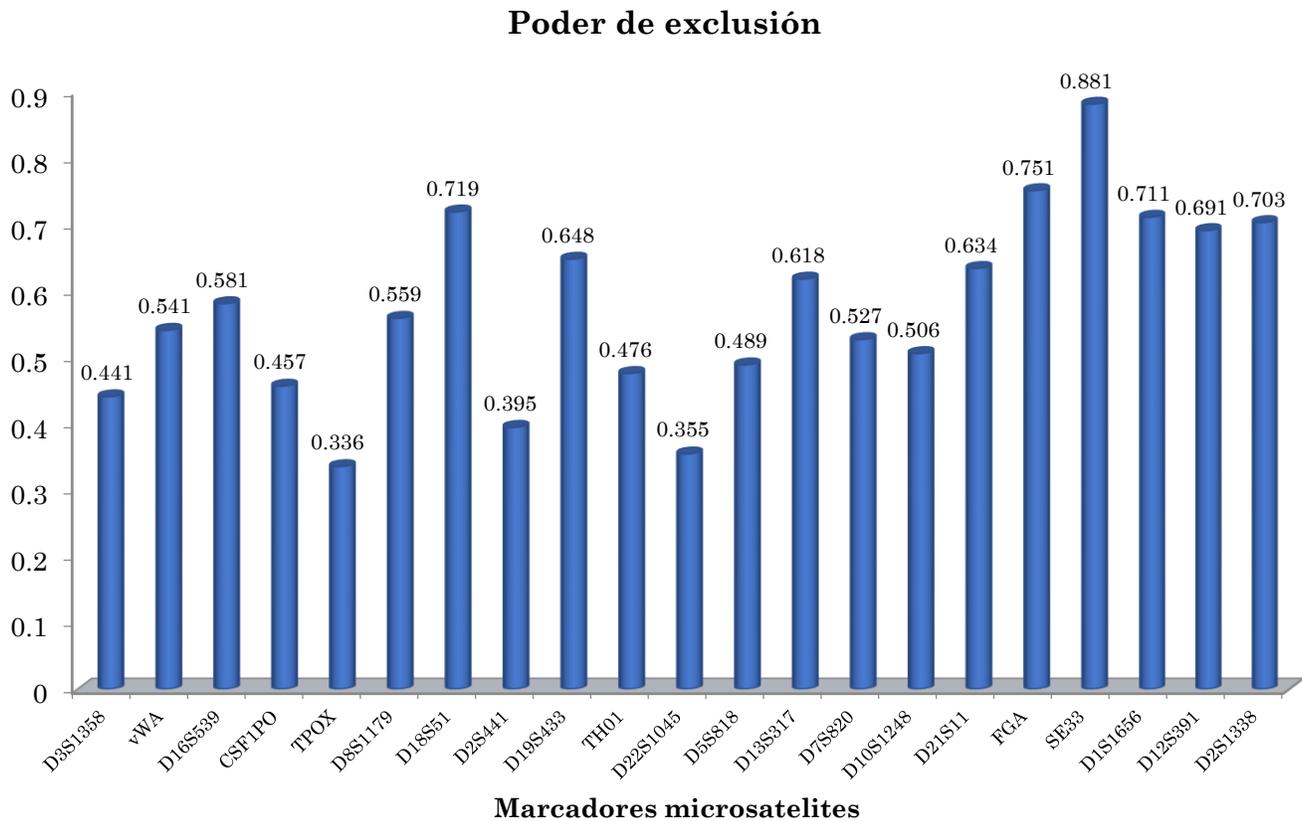
**Marcadores microsatelites**

**Fuente: Tabla 15.**

La probabilidad de coincidencia es la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar tengan genotipos idénticos en un sistema concreto o en un conjunto de sistemas. Los marcadores genéticos que poseen un menor grado de probabilidad de coincidencia y por lo tanto mayor efectividad para su uso forense son los marcadores: SE33: 0.009, FGA: 0.029, D1S1656 y D18S51: 0.030, D2S1338: 0.035, D12S391: 0.042. Cada una de estas probabilidades indican que la posibilidad de que se encuentre individuos con genotipos idénticos es muy baja.



**Grafico 3. Poder de exclusión de la población nicaragüense utilizando marcadores microsatélites, Octubre-Noviembre 2016.**

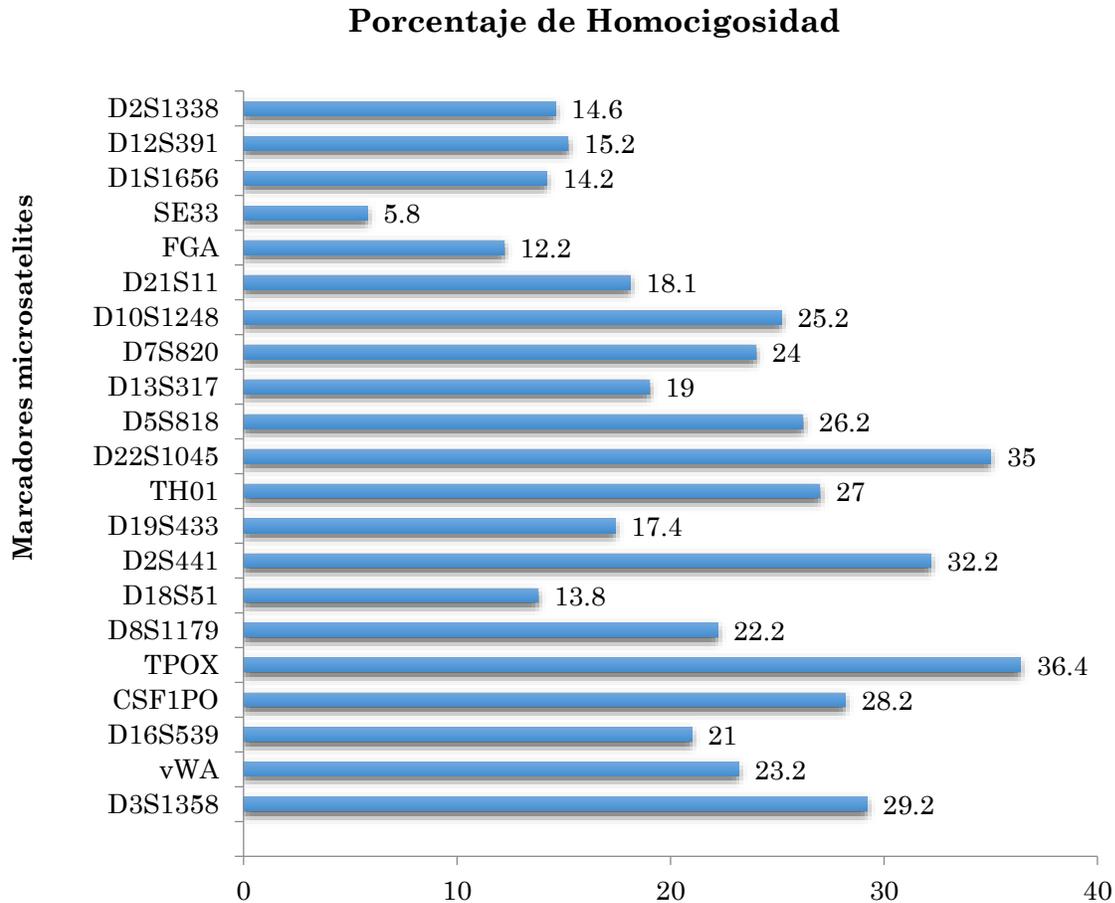


**Fuente: Tabla 15.**

El poder de exclusión cuantifica la validez de un marcador genético en una población determinada, en paternidad se define como la proporción de peritaciones en las que la supuesta paternidad de un individuo podrá ser definitivamente descartada, en base a un marcador genético. El poder de exclusión está en función directa con el grado de polimorfismo de un marcador genético, y por lo tanto, dependerá del número de alelos encontrados en ese marcador y éste determinará la frecuencia alélica de éste en la población. Los marcadores que presentan menor poder de exclusión son los marcadores: TPOX (0.336), D2S441 (0.395) y D22S1045 (0.355), por lo tanto tienen mayor efectividad para su uso forense.

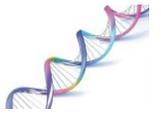


**Grafico 4. Porcentaje de homocigosidad de la población nicaragüense utilizando marcadores microsatélites, Octubre-Noviembre 2016.**

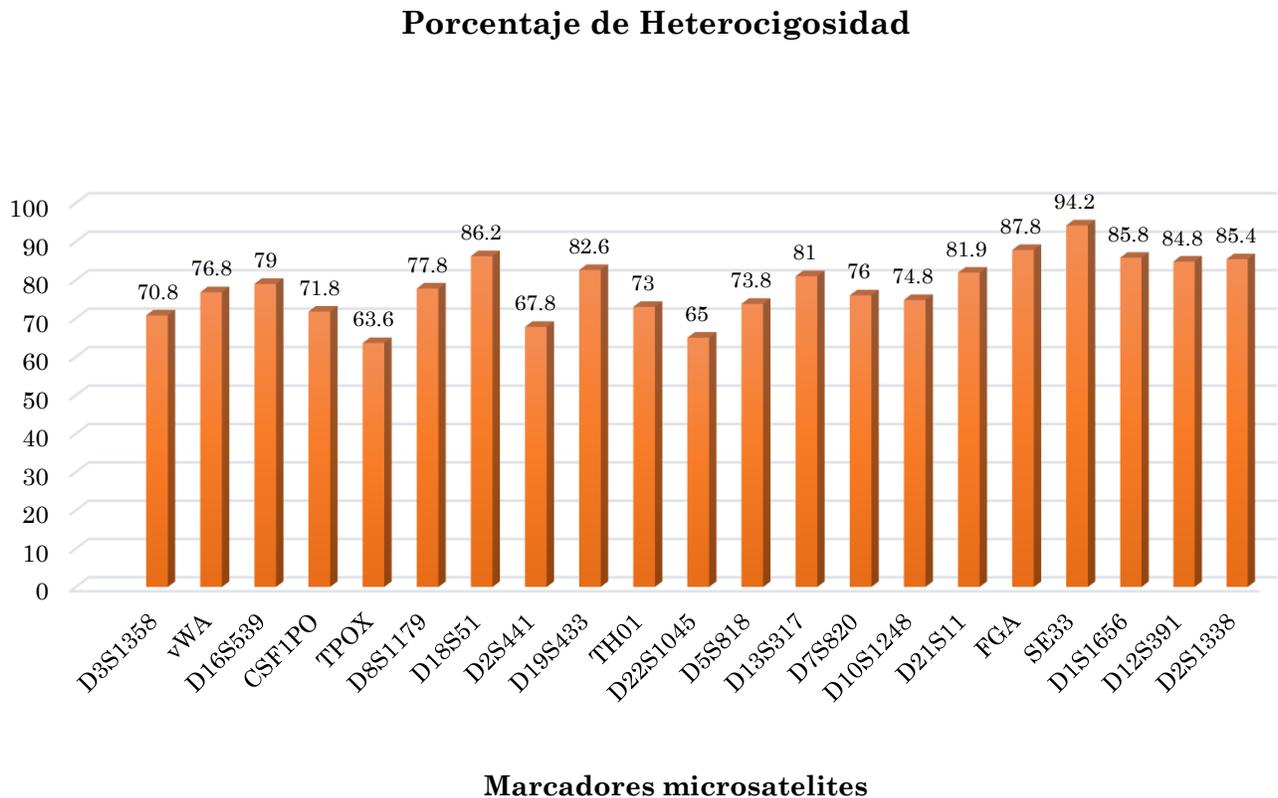


**Fuente: Tabla 16.**

Los marcadores TPOX, D2S441 y D22S1045 presentan los valores más altos de homocigosidad lo que produce una disminución de variabilidad genética y pérdida de poder de discriminación.



**Grafico 5. Porcentaje de heterocigosidad de la población nicaragüense utilizando marcadores microsatélites, Octubre-Noviembre 2016.**



**Fuente: Tabla 16.**

La medida de la cantidad de heterocigosidad en una población a través de los marcadores es utilizada como un indicador general de la cantidad de variabilidad genética.

La variabilidad genética se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas. Para que la selección natural pueda actuar sobre un carácter, debe haber algo que seleccionar, es decir, varios alelos para el gen que codifica ese carácter. Además, cuanto más variación haya, más evolución hay. Ronald Fisher demostró matemáticamente que cuantos más alelos existan para un gen, más probabilidad hay de que uno de ellos se imponga al resto (se fije). Esto implica que cuanto más



variabilidad genética exista en una población, mayor será el ritmo de la evolución. Esto se conoce como teorema fundamental de la selección natural de que establece y varía en cambios y transformaciones.

Los marcadores que manifiestan un mayor grado de variabilidad genética son los marcadores: D18S51, FGA, SE33, estos marcadores son sistemas que poseen numerosos alelos intermedios y una gran variabilidad en estructura en longitud, son sistemas más complejos y de alta microvariación.

Los marcadores en los que la población posee poca variabilidad genética son: TPOX, D2S441 y D22S1045, debido a su bajo porcentaje de heterocigocidad y a la poca cantidad de alelos en su sistema.



## X. CONCLUSIONES

1. Se logró determinar la frecuencia de alelos en la población nicaragüense encontrándose que los alelos más frecuentes son:

<b>CSF1PO</b>	10,11,12	<b>D19S433</b>	13,14,15	<b>D2S1338</b>	19,20,23
<b>D12S391</b>	18,19, 20	<b>D2S441</b>	10,11,14	<b>D10S1248</b>	13,14,15
<b>D13S317</b>	9,11,12	<b>D16S539</b>	10,11,12	<b>D3S1358</b>	15,16,17
<b>D7S820</b>	10,11,12	<b>D21S11</b>	29,30	<b>D8S1179</b>	13,14
<b>FGA</b>	23, 24, 25,	<b>D5S818</b>	11,12	<b>D18S51</b>	14,15,17
<b>SE33.</b>	18	<b>D1S1656</b>	15,16, 17.3	<b>D22S1045</b>	15,16
<b>TPOX</b>	8,11	<b>vWA</b>	16,17,18	<b>TH01</b>	6, 7

2. Los parámetros estadísticos forenses analizados nos indican que la probabilidad de que en la población nicaragüense se encuentren individuos con genotipos idénticos utilizando este sistema de marcadores microsatélites es 0.000000001% y la probabilidad de que dos individuos no relacionados y tomados al azar puedan ser diferenciados genéticamente por estos marcadores es >99.999999999%.
3. El porcentaje de heterocigosidad promedio fue de 78%, lo que indica que existe alta variabilidad genética en la población, y 22 % de homocigosidad.
4. El análisis de los 21 marcadores microsatélites dio lugar a la actualización de la base de datos de marcadores genéticos del IML (Instituto de Medicina Legal), cuyo uso facilitara la identificación genética en las investigaciones de identidades, en los casos de filiación parental e identificación de los responsables en casos de delitos sexuales por violación, que se realizan en esta institución.



## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Al Laboratorio de ADN del IML (Instituto de Medicina Legal), realizar un estudio de ADN mitocondrial para conocer el origen poblacional en nuestro país.
2. A estudiantes del departamento de Bioanálisis clínico, dar seguimiento y ampliar el presente estudio con el análisis de nuevos grupos poblacionales utilizando marcadores microsatélites, a fin de establecer estudios de comparación con otras poblaciones a nivel mundial, y de esta manera aportar a la implementación de este sistema investigativo en Nicaragua.



## XII. BIBLIOGRAFIA

Admixture and population stratification in African Caribbean population. *Annals of Human Genetics*, Oct 1, on line.

Alonso, AA. Conceptos básicos de ADN forense. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Servicio de Biología. Madrid. Recuperado de <http://190.104.117.163/a2015/julio/forenses/contenido/ponencias/Antonio%20Alonso/Conceptos%20basicos%20de%20ADN%20forense.pdf>

Alvesa C., Gusmao L., Damasceno A., Soares B., Amorim A. (2004). Contribution for an African autosomic STR database (AmpF/STR Identifiler and Powerplex 16 System) and a report on genotypic variations (Mozambique). *Forensic Sci. Int.*, 139: 201-205.

Alvesa C., Gusmao L., López.Parra A, SoledadMesa M., Amorim A., ArroyoPardo E. (2005). STR allelic frequencies for an African population sample (Equatorial Guinea) using AmpF/STR Identifiler and Powerplex. *Forensic Sci. Int.*, 148:239-242.

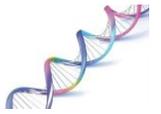
Ayala, F.J. (2001): *La teoría de la evolución*. Madrid: Temas de hoy.

Beleza S., Alves C., Reis F., Amorim A., Carracedo A., Gusmao L., (2004). 17 STR data (AmpF/STR Identifiler and Powerplex 16 System) from Cabinda (Angola). *Forensic Sci. Int.*

Benn,TJ, Bonilla C, Robbins C.M, Waterman L, Moses T.Y, Hernandez W, Santos E.R, Bennett R, Aiken W, Tullock T, Coard K, Hennis A, Wu S, Nemesure B, Leske M.C,Freeman V, Carpten J y Kittles R.A.

Benn,TJ, Kittles R.A, Stone A.C. (2007).Mitochondrial and Y chromosome diversity in the EnglishSpeaking Caribbean. *Annals of Human Genetics*, 71: 782-790.

Bertorelle y Excoffier. (1998). Inferring Admixture Proportions from Molecular Data. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1298-1311.



Bravo M.L., Moreno M.A., Bules J.J., Salas A., Lareu M.V. y Carracedo A. (2001) Autosomal STR genetic variation in negroid Chocó and Bogotá populations. *Int.J.Legal Med.* 115: 102-104.

Butler J.M. (2005). *Forensic DNA typing*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. P 201-240

Butler J.M. (2006) Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat loci used in Human Identity Testing. *Journal Forensic Sciences* 51(2): 253-265.

Butler J.M., Schoske R., Vallone P.M., Redman J.W. y Kline M. (2003) Allele Frequencies for 15 Autosomal STR Loci on U.S. Caucasian, African American, and Hispanic Populations. *J. Forensic Science.* 48, N°4.

Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd Edition. Elsevier Academic Press.  
Recuperadode:[https://books.google.com.ni/books?hl=es&lr=&id=gwDyBq2xLjIC&oi=fnd&pg=PP2&dq=+BUTLER,+J.M.+\(2005\)+Forensic+DNA+Typing,+2nd+Edition.+Elsevier+Academic+Press&ots=exS35vuicF&sig=adhV92BUPQbxnXuTaz4Wla68cM&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ni/books?hl=es&lr=&id=gwDyBq2xLjIC&oi=fnd&pg=PP2&dq=+BUTLER,+J.M.+(2005)+Forensic+DNA+Typing,+2nd+Edition.+Elsevier+Academic+Press&ots=exS35vuicF&sig=adhV92BUPQbxnXuTaz4Wla68cM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Cabrera W. (1980). *San Andrés y Providencia, Historia*. Ed. Cosmos, Bogotá.

Camacho M., Benito C., Figueiras A.M., (2007). Allelic frequencies of the 15 STR loci included in the AmpF STR Identifiler™ PCR Amplification Kit in an autochthonous sample from Spain. *Forensic Sci.Int.* 173: 241245.

Carracedo, A. ADN: la genética forense y sus aplicaciones en investigación criminal. Instituto de Ciencias Forenses. Universidad de Santiago de Compostela. Recuperado de: [http://sgfm.elcorteingles.es/SGFM/FRA/recursos/doc/2013/PONENCIAS/Junio/1559347945\\_1062013102130.pdf](http://sgfm.elcorteingles.es/SGFM/FRA/recursos/doc/2013/PONENCIAS/Junio/1559347945_1062013102130.pdf).



CavalliSforza LL, Bodmer W F.(1999). The genetics of Human Populations. New York: Dover Publications. 965 p.

Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. 1994. The history and Geography of Human Genes. New York. Princeton University Press. 416 p.

Diaz V, Rivas P, Olivero C, Carracedo A., (2008). The distribution of allele frequencies of 15 STRs in Dominican population. In Press, Forensic Sci. Int., Genetics, supplement series.

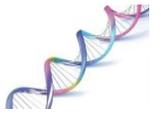
Dupanloup I. y Bertorelle G. (2001). Inferring Admixture Proportions from Molecular Data : Extension to Any Number of Parental Populations. Mol. Biol. Evol. 18(4):672–675.

Eljach L. (2007). Análisis preliminar de la estructura genética de 7 poblaciones humanas del Caribe colombiano, mediante el uso de 9 sistemas microsatélites. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología.

Evett IW, Weir BS (1998). Interpreting DNA evidence. Sinauer. MA, USA. GlobalFiler Express PCR Amplification Kit. October 2012 revision A. cooperación Life Technologies. Recuperado de <https://tools.thermofisher.com/downloads/User-Guide-GlobalFiler-Express-PCR-Kit.pdf>.

Evett I. W., Gill P. D., Lambert , Oldroyd N., Frazier R., Watson S., Panchal S., Connolly A., Kimpton C.,(1997). Statistical analysis of data for three British ethnic groups from a new STR multiplex. Int J Legal Med.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online.



Flores-Obando, R., Budowle B., y Huete-Perez J.,(2004). Allele Frequencies for Markers CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820, D13S317 in the General Population of Nicaragua. *J. Forensic Science*, March, 49, N° 2: 1-2.

Goldstein D, Schlotterer C. (1999) *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press, Londres. 352 p.

Gómez M.V., Reyes M.E., Cárdenas H., García O., (2003). Genetic variation for 12 STRs loci in a Colombian population (Department of Valle del Cauca). *Forensic Sci. Int.*

Goncalves R., Jesus J., Fernandes A.T., Brehm A.,(2002). Genetic profile of a multi-ethnic population from Guiné-Bissau (west African coast) using the new PowerPlex 16. *Forensic Sci. Int.*

Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Guo, S. W. & Thompson, E. A., (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*.

Hernández A.W, Trejo, FM.(2014) Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. Recuperado de <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/estudio-gentico-poblacional-de-frecuencias-allicas-para-15-marcadores-str-presentes-en-la-poblacion-del-estado-de-zacatecas-aplicado-a-la-prctica-forense.pdf>.

Jobling M.A, Gill P. (2004) *Encoded Evidence: DNA in forensic analysis*. *Nature Reviews* (5):739-752.

Martínez, M.B., (1999). *La prueba del ADN en Medicina Forense.*, Masson (Ed.), Barcelona, España.



Morales, B., Electroforesis. (2008). Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx//archivero/Exposicion\\_electroforesis\\_5087.pamyddf](http://depa.fquim.unam.mx//archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pamyddf).

Pontificia Universidad Javeriana (2008) Electroforesis en <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html> revisado el sábado 20 de septiembre de 2008.

Revista digital de divulgación sobre criminalística, criminología y ciencias forenses. Publicación mensual. Segunda época. Año 1, número 12, marzo de 2014. Recuperado de [https://issuu.com/raoulperez/docs/expresion\\_forense\\_no\\_12\\_marzo\\_2014](https://issuu.com/raoulperez/docs/expresion_forense_no_12_marzo_2014).

Salazar, A, Sandoval, A. y Armendariz, J. Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Primera edición 2013. México DF. Editorial McGraw Hill interamericana.

A large, stylized graphic of a DNA double helix in the background, rendered in yellow, green, cyan, and purple colors, winding upwards from the bottom left towards the top right.

# ***XIII. ANEXOS***