

"Caracterización genética de la población nicaragüense. Implicaciones en casos de paternidad y medicina forense."

Rafael E. Flores Obando, Ian Roustán Espinoza,
Luis I. Marín Argüello y Jorge A. Huete-Pérez.



Cuaderno N° 14
Colección Naturaleza

Cuadernos de Investigación de la UCA es una publicación de la Dirección de Investigación de la Universidad Centroamericana (UCA). Los trabajos publicados en los *Cuadernos* expresan las opiniones de sus autores y no necesariamente la de la Dirección de Investigación de la UCA. Su contenido puede ser reproducido, citando la fuente y enviando copia de lo publicado a la siguiente dirección: *Cuadernos de Investigación de la UCA*, Dirección de Investigación, Apartado postal 69, Fax: (505) 267-0106, Teléfono: (505) 278-3923 al 3927 - Ext. 192 y 236, Managua, Nicaragua. Correo electrónico: ucapubli@ns.uca.edu.ni

Director

P. Eduardo Valdés S. J.

Asistentes de edición

Iván Marín Argüello

Alvaro Rivas

Mercadeo y distribución

Rogerio Medina

Impresión

Centro Digital XEROX - UCA

Diseño y diagramación

Alejandro E. Bermúdez Ortega

Xerox de Nicaragua

ISSN 1729-2034

La Universidad Centroamericana (UCA) de Managua es una universidad privada de servicio público e inspiración cristiana, administrada por los jesuitas. Fue fundada en 1960.

Además de la Dirección de Posgrado, la UCA posee cinco Facultades: Humanidades, Ciencias Jurídicas, Ciencias Económicas y Empresariales, Comunicación, y Ciencia y Tecnología del Ambiente.

También forman parte de la Universidad, el *Instituto de Investigación y Desarrollo "Nitlapán"*, el *Instituto de Historia de Nicaragua y Centroamérica (IHNCA)*, el *Centro de Análisis Socio Cultural (CASC)*, el *Programa de Promoción de la Reforma Educativa de América Latina (PREAL)*, el *Instituto de Encuestas y Sondeo de Opinión (IDESO)*, el *Centro de Investigación y Documentación de la Costa Atlántica (CIDCA)*, el *Instituto Juan XXIII*, el *Centro de Investigación del Camarón (CIC)*, el *Centro de Malacología*, la *Estación Solar VADSTENA-UCA* y el *Centro de Biología Molecular (CBM)*.

*Al insigne educador jesuita Ignacio Astorqui (q.e.p.d.),
por deslumbrarnos con la magia de la química y la belleza de la biología,
y principalmente por su magnífico ejemplo.*

A Juan R. Zarruk (q.e.p.d) por su respaldo y estímulo

*"Toda nuestra ciencia, comparada con la realidad,
es primitiva e infantil. Y sin embargo,
es lo más precioso que tenemos."*

Albert Einstein

"Caracterización genética de la población nicaragüense. Implicaciones en casos de paternidad y medicina forense."

Rafael E. Flores Obando, Ian Roustán Espinoza,
Luis I. Marín Argüello y Jorge A. Huete-Pérez.

Centro de Biología Molecular
Universidad Centroamericana
Septiembre 2003

ÍNDICE

Prólogo.....	2
I. Introducción.....	4
Bases moleculares de la tipificación de ADN.....	5
Fuentes de ADN para la tipificación de ADN.....	7
Sangre.....	7
Semen.....	7
Tejidos.....	8
Raíces de cabello.....	8
Saliva.....	8
Métodos de extracción de ADN.....	8
Extracción por Chelex.....	9
Extracción por Centricon 100.....	9
Extracción Orgánica.....	9
Métodos de análisis de ADN.....	9
Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)..	9
Reacción de la Polimerasa en Cadena.....	10
Marcadores moleculares para identificación humana.....	10
Número variable de repeticiones concatenadas.....	10
Repeticiones cortas concatenadas.....	13
Bases de datos de ADN.....	15
Análisis estadístico en tipificación humana por ADN.....	15
Frecuencias alélicas.....	16
Ley de Hardy - Weinberg.....	16
Probabilidad de Coincidencia.....	17
Poder de discriminación.....	17
Poder de exclusión.....	17
Índice típico de paternidad.....	17
II. Objetivo.....	18
III. Materiales y métodos.....	18
IV. Resultados experimentales.....	23
V. Discusión.....	43
VI. Conclusiones.....	46
VII. Agradecimientos.....	47
VIII. Bibliografía consultada.....	48
IX. Anexo.....	53
Notas generales.....	53
Recolección y manejo del material biológico.....	54
Cuidados especiales con algunos tipos de muestras.....	55
X. Glosario.....	56

Prólogo

La publicación del genoma humano por el Consorcio Internacional para la Secuenciación del Genoma Humano*, fue el punto culminante de una carrera científica iniciada con el redescubrimiento de las Leyes de Mendel en los albores del siglo XX.

Tal como señalan los autores de esta publicación, el proceso que conllevó a la publicación de la secuencia del genoma humano, pasó por cuatro fases que cronológicamente se corresponden bastante bien con cada uno de los cuatro cuartos del siglo. En la primera fase, se definió la base celular de la herencia: los cromosomas. En la segunda, se definió la base molecular de la herencia: la doble hélice del ADN. En la tercera fase, se estableció la base de información de la herencia, con el descubrimiento de los mecanismos mediante los cuales las células "leen" la información contenida en los genes y, con la invención de la tecnología de ADN recombinante, los científicos fueron capaces de hacer lo mismo. El último cuarto de siglo estuvo marcado por la carrera desenfrenada para descifrar los primeros genes y luego genomas completos.

Ahora sabemos que en realidad no hay un solo genoma humano sino miles de millones. La publicación mencionada antes lo que nos ofrece es un importante consenso, pero en el nivel de las secuencias de nucleótidos la variabilidad es grande e importante, no solamente por su utilidad en identificar violadores y asesinos. En esta variabilidad se encuentra encerrada la clave de muchas enfermedades, de muchos talentos y la información sobre el origen y la historia de nuestra especie.

Es precisamente en este contexto que se publica el Cuaderno de Investigación No. 14, Colección Naturaleza con el título "Caracterización genética de la población nicaragüense. Implicaciones en casos de paternidad y de medicina forense", elaborado por el Centro de Biología Molecular de la UCA, dirigido por el Dr. Jorge Huete Pérez.

Esta publicación seguramente va mucho más allá de las aplicaciones sugeridas en el título. Su verdadera importancia radica en el trabajo tesonero, silencioso y constante que el Dr. Huete y su grupo han venido realizando en los últimos años, en medio de grandes limitaciones económicas y rodeados muchas veces de la incomprensión de una sociedad que no asimila todavía la importancia de la ciencia para combatir la pobreza y lograr un desarrollo verdaderamente sostenible. Este trabajo ha permitido que un grupo de jóvenes entusiastas y talentosos hayan puesto bases firmes para el desarrollo de la Biología Molecular en Nicaragua.

Espero que esta publicación atraiga la atención del gobierno y de los políticos del país para que en adelante este grupo pueda seguir realizando su trabajo en mejores condiciones. Después de todo, buena parte de nuestro futuro dependerá de nuestra capacidad de entender y utilizar las nuevas tecnologías y ninguna es más importante y decisiva que la que permite escudriñar las claves mismas de la vida.

Dr. Ernesto Medina S. Rector, UNAN-León.

* "Initial sequencing and analysis of the human genome". *Nature* (2001) 409, 860-921.

Resumen

La identificación humana por tecnología de ADN tiene una doble orientación: la determinación biológica de la paternidad y la investigación forense. Ambos procesos se han visto auxiliados significativamente con la implementación reciente de la tecnología de detección de polimorfismos y otros sistemas biotecnológicos. La utilización de metodologías tales como la PCR*, RFLP** y STR***, entre otras, en conjunto con el establecimiento de bases de datos poblacionales, han revolucionado y acelerado la investigación policial y, a la vez, apoyado la administración de justicia demandada por múltiples organismos defensores de los derechos de la niñez.

En este Cuaderno de Investigación se presentan los resultados de un trabajo realizado en el período 2002-2003, estableciéndose una base de datos de ADN específica para la población nicaragüense. Se abordan temas como: tecnología forense, determinación de paternidad, aplicaciones y procedimientos de laboratorio de tecnología de ADN. Finalmente se discuten algunas implicaciones éticas, sociales y legales, relacionadas al uso de estas tecnologías en el contexto nicaragüense.

Abstract

DNA technology is fundamental in the identification of human beings. Two processes in which the technology is particularly used are the biological determination of paternity and forensic investigation. These processes have been significantly augmented through the implementation of polymorphic detection technology and other biotechnology systems. Utilization of technologies such as PCR, RFLP and STR, among others, in conjunction with the creation of population data bases, have revolutionized and accelerated the police investigative process and have provided support for the administration of justice in benefit of vulnerable sectors of society.

In this paper we present the results of our research carried out between 2002 and 2003 in which we created a DNA specific database for Nicaragua. We discuss topics such as forensic technology, determination of paternity, and laboratory procedures and applications of DNA technology. We also discuss some of the ethical, social and legal implications related to the use of these technologies in a Nicaraguan context.

* del inglés, *Polymerase Chain Reaction, PCR.*

** del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP.*

***del inglés, *Short Tandem Repeats, STR.*

I. Introducción

El uso de la biotecnología moderna para resolver problemas de orden social y legal tiene una enorme repercusión en el mundo actual. La delincuencia, violencia e intolerancia de la sociedad, particularmente en las regiones pobres del planeta, las frágiles estructuras familiares y frecuentes disputas de paternidad o parentesco, las migraciones por causas de guerras o económicas, la vulnerabilidad ante desastres naturales como terremotos, erupciones volcánicas e inundaciones, generan situaciones que demandan la identificación biológica de individuos o restos humanos como respaldo para la administración de justicia.

A la determinación de la identidad mediante el uso del ADN se le llama de diversas maneras, tales como definición del genotipo, huellas dactilares, prueba de ADN, el análisis de ADN, el tipo y perfil del ADN, entre otras. Este análisis parte de la premisa de que cada individuo presenta un perfil genético propio individuo y diferente de cualquier otro, lo cual permite definir claramente las características genotípicas de un individuo.

Si bien existe una variedad de aplicaciones de las tecnologías de ADN en la identificación de individuos, sus usos más frecuentes se concentran en la determinación de paternidad y en un contexto forense de pruebas inculpatórias en casos legales, como los casos de violaciones. En la determinación de la paternidad se estudia el perfil de ADN del presunto padre comparándolo con el del hijo o hija, quien presenta un perfil de ADN que representa la combinación del perfil del padre con el de la madre. El análisis de ADN en la medicina forense, en cambio, analiza la evidencia contenida en el material genético obtenido

en la escena del crimen, con objeto de establecer una posible relación del sospechoso con la víctima y la escena del crimen.

Cada población de un país dado tiene sus estructuras genéticas muy particulares, lo cual se demuestra con los polimorfismos caracterizados por grupos sanguíneos, proteínas séricas, genes del complejo de histocompatibilidad y microsátélites, entre otras metodologías. Estas razones argumentan a favor de la necesidad que cualquier estudio molecular considere la estructura genética de la población de interés, en vez de tomar como referencia las estructuras genéticas de otras poblaciones distintas.

La información de la estructura genética de una población se sistematiza en base de datos de ADN, comprendiendo información de cierta cantidad de marcadores moleculares. Todo resultado de análisis de ADN, para paternidad o criminalística, se confronta con esta información de la estructura genética poblacional. En términos estadísticos, mientras más marcadores moleculares se utilicen en un análisis, menor la posibilidad de que el perfil genético de un individuo pudiera coincidir con el de cualquier otro individuo de una misma población.

La utilización de estas bases de datos poblacionales tiene una gran repercusión en las sociedades. Sus usos van desde apoyar la investigación policial para seguir pistas que conlleven a la solución de crímenes y aclaración de hechos violentos, hasta la determinación de la paternidad que resulte en la garantía de los derechos ciudadanos de menores. Otros usos incluyen la determinación de identidad en restos de ciudadanos

desaparecidos, así como también de restos de interés arqueológico y antropológico.

El estudio de marcadores genéticos en cromosomas humanos y el desarrollo de nuevas técnicas para la detección de regiones polimórficas, como resultado del Proyecto del Genoma Humano ha conllevado a un progreso extraordinario y rápido de la medicina forense. La tipificación de ADN en la investigación criminal consiste en la comparación de los perfiles de ADN, procedentes de evidencia forense. Con los perfiles de ADN de uno o más individuos desconocidos, para confirmar o excluir la participación de éstos en los hechos investigados.

Desde el trabajo pionero de Alec Jeffreys, en 1984, la aplicación de sistemas de tipificación de ADN al campo forense ha evolucionado considerablemente. Las originales y altamente discriminativas sondas multi-loci, que detectaban variaciones en loci con número variable de repeticiones en tandem, VNTR*, fueron reemplazadas por la técnica de detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, RFLP.

Aunque la tipificación de VNTR / RFLP requería de grandes cantidades de ADN de alto peso molecular, no era posible automatizarlo y tomaba tiempos prolongados obtener un perfil de ADN. Con la invención de la técnica de PCR se solucionaron muchos de estos problemas y se pudo estudiar más fácilmente y en menos tiempo los VNTR y, además, las secuencias cortas en tandem, STR.

Hoy en día es posible estudiar más de una docena de marcadores STR para muchos individuos en un solo experimento. Este desarrollo de la tecnología de tipificación de

ADN ha fomentado la popularidad de los marcadores STR entre la comunidad científica internacional para su aplicación en ciencia forense y en estudios de paternidad.

Bases moleculares de la tipificación ADN

En el cuerpo humano hay aproximadamente 1012 células, en cuyo núcleo se encuentran los cromosomas. En esos cromosomas están todas las instrucciones y la información necesaria para la creación y desarrollo del ser humano. Cada padre contribuye con un cromosoma de los veintitrés pares encontrados normalmente en cualquier persona. Dentro de cada cromosoma hay más de 100,000 pares de genes que son las unidades fundamentales de la herencia. Los genes están constituidos de ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual es un polímero, conformado por una larga cinta de unidades repetidas llamadas nucleótidos los que pueden ser de cuatro tipos: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Así como el orden de las letras del alfabeto determinan la información contenida en las palabras, de igual forma el orden de estas cuatro bases en la cadena de ADN determina la información genética contenida en la cadena. Una molécula completa de ADN está compuesta de dos cadenas antiparalelas de polímeros (Coleman y Sweson, 1994) (Ilustración 1).

Los genes constituyen solamente una pequeña fracción de todo el ADN en el genoma. En estas estructuras existen regiones de ADN que codifican** para una proteína en particular, llamadas exones, y regiones que no codifican para una proteína y que por lo tanto no son funcionales, llamados intrones. Estas regiones no codificantes, intrones, son frecuentemente usadas en análisis forense y de

* del inglés, Variable Number of Tandem Repeat, VNTR

** En bioquímica "codificar" significa contener la instrucción necesaria para que se sintetice una proteína dada

paternidad, debido a que por su carácter infuncional no tienden a variar como un resultado del proceso de selección natural, y por lo tanto no ejercen influencia alguna en los análisis poblacionales.

Los genes determinan los rasgos genéticos, incluyendo aquellos que dan a los individuos características específicas (color de los ojos o del cabello), así como características comunes (dos ojos, dos brazos) (Coleman y Sweson, 1994). Por otra parte, la alteración estructural de algunos genes puede dar lugar a la predisposición de diversas enfermedades

tales como la fibrosis quística, enfermedad causada por la mutación en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, CFTR.

Cada gen puede tener diferentes versiones (hasta 100 o más) llamadas alelos, los que en términos de función son muy idénticos de una persona a otra, aunque no así en términos de estructura, lo cual diferencia a una persona de otra. Estas diferencias, llamadas polimorfismos, son elementos claves en la realización de la identificación humana por ADN.

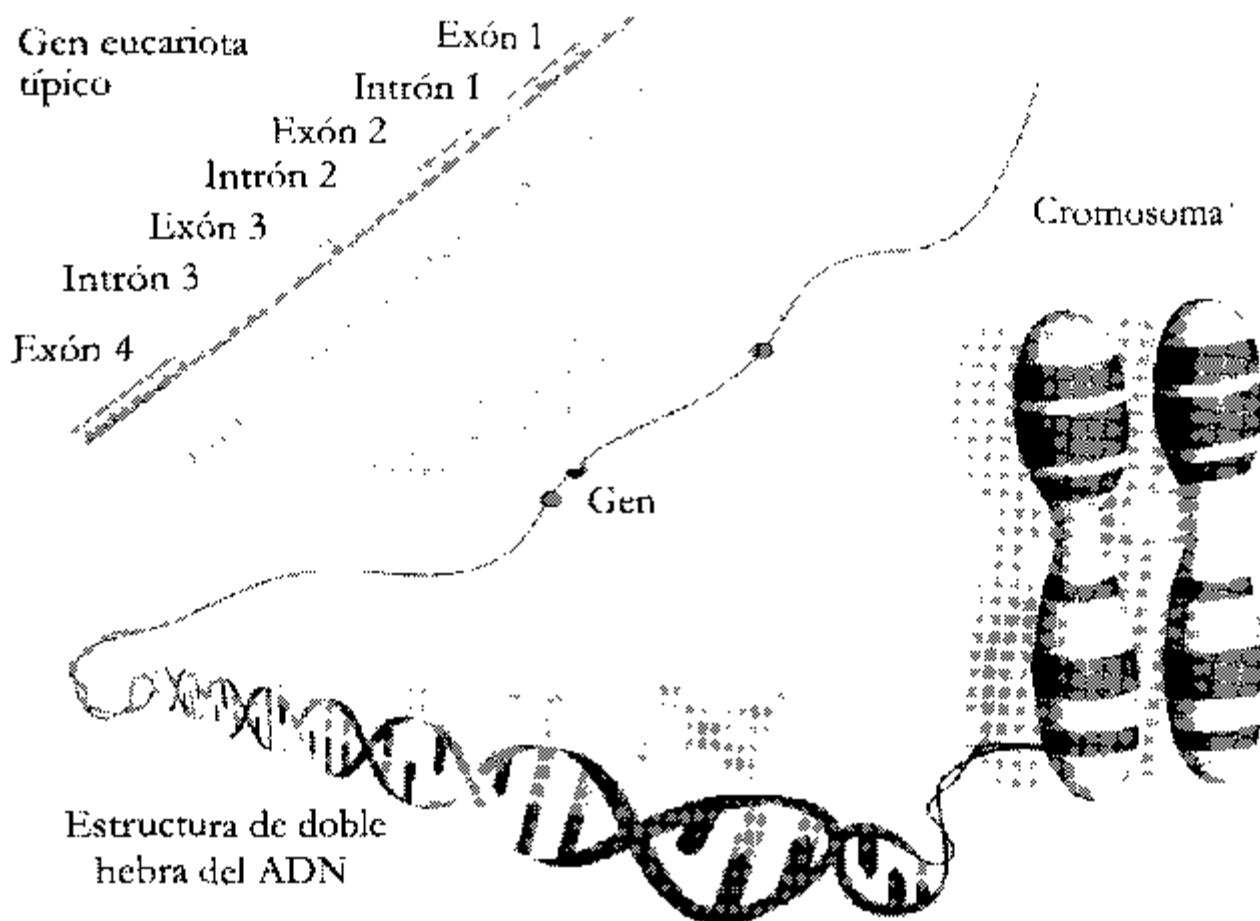


Ilustración 1. Diagrama de la célula y su información genética. En este diagrama se muestra cómo está organizado el material genético a nivel molecular, partiendo desde las unidades estructurales de los genes llamados exones e intrones hasta un nivel más complejo de organización como es el cromosomal.

En ciencia forense se estudian principalmente dos tipos de polimorfismos de ADN para la identificación de individuos:

- **Número variable de repeticiones concatenadas (VNTR)** las cuales son polimorfismos de la longitud del ADN en locus* específicos. Estas regiones VNTR consisten en estrechas regiones de ADN construidas de secuencias corta y repetitivas de ADN. El número de veces que estas secuencias son repetidas repercute en la longitud física de la molécula de ADN en ese locus específico. Estas variaciones pueden ser examinadas por el método conocido como Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, RFLP. Un ejemplo de VNTR es el locus D1S80, el que comprende una secuencia de 16 pares de bases que se repite múltiples veces (Coleman y Sweson, 1994).

- El segundo tipo de polimorfismo en el ADN es una diferencia en los nucleótidos en un par de base específico. Estas variaciones pueden ser examinadas por el método conocido como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Un ejemplo de esto es el polimorfismo de un solo nucleótido, SNP**. Estos son los tipos mas comunes de polimorfismos en el genoma humano, con una frecuencia aproximada de un SNP por cada kilobase (Coleman y Sweson, 1994).

Fuentes de ADN

El ADN se encuentra en todas las células del cuerpo. Las fuentes de ADN más frecuentemente usadas para tipificación son: sangre, semen, tejidos, raíces de cabellos y saliva.

Sangre

La sangre está compuesta en un 22 por ciento de elementos sólidos y un 78 por ciento de agua. El plasma, en el cual están suspendidas las células sanguíneas, incluye: glóbulos rojos, los cuales son células carentes de núcleos y cuya principal función es transportar oxígeno desde los pulmones hacia el resto del cuerpo; y glóbulos blancos, los cuales son células nucleadas y ayudan a combatir infecciones.

La sangre es el tipo de muestra más comúnmente utilizada en estudios de paternidad y criminalística. La superficie en que una mancha de sangre puede ser encontrada puede afectar profundamente la habilidad para desarrollar exitosamente un análisis de ADN. La extracción de ADN de sangre seca encontrada en vidrio, metal, plástico o ropa es simple. En cambio, en vinilo, alfombras, sillas de automóviles u otras fibras densas o coloreadas, se requiere de procedimientos adicionales para la extracción de ADN. Esto se debe a que estas superficies contienen sustancias que inhiben el proceso de las pruebas del ADN, las cuales requieren ser removidas por una variedad considerable de procesos de purificación (Coleman y Sweson, 1994).

Semen

Las manchas de semen son las evidencias que se someten con mayor frecuencia para análisis de ADN en casos de violación y son típicamente examinadas y probadas por métodos convencionales previos al análisis de

* locus se define como la posición de un gen en un cromosoma.

** del inglés, Single-Nucleotide Polymorphism, SNP.

ADN. La mezcla de células puede ser usualmente un factor de confusión cuando se realiza una prueba estándar para la tipificación de la sangre. En el caso del análisis del ADN, el proceso de lisis diferencial (una desintegración controlada de células) es usado para separar las células espermáticas (fracción masculina) de las células no-espermáticas (fracción femenina) (Coleman y Sweson, 1994).

El semen azoospermico es periódicamente encontrado en la investigación de casos de violación con variación en los resultados analíticos. La cantidad de ADN contenido en un mililitro de muestra eyaculada por un individuo espermico es aproximadamente de 0.5 mg proveniente de los espermatozoides y, en cambio, solamente 0.03 mg se obtienen de leucocitos y células epiteliales. En el caso de un individuo azoospermico, dado que carece de células espermáticas, el ADN extraído proviene únicamente de leucocitos y células epiteliales constituyendo un 6.3% del total de ADN obtenido de un individuo espermico. Aún en estos casos de azoospermia, la técnica de PCR puede ser muy útil porque la amplificación del ADN por PCR es rápida, sensible y requiere solamente de pequeñas cantidades (2.5 - 5.0 ng) de moléculas de ADN de bajo peso molecular (< 2 Kb) (Skinker y col, 1997).

Tejidos

El aislamiento de ADN, de tejidos tomados de autopsia es un proceso simple y directo. En los laboratorios, los tejidos que se reciben con mayor frecuencia provienen de tejidos descompuestos parcialmente. La estabilidad del ADN a veces es más lenta en tejidos blandos tales como el hígado y el riñón; y mayor todavía en hueso denso y dientes (Coleman y Sweson, 1994).

Raíces de cabello

De una a cinco raíces de cabello pueden contener suficiente tejido para realizar análisis por RFLP. El cabello mudado contiene solamente cantidades trazas de ADN, y son generalmente útiles para analizar por los métodos actualmente usados de rutina en medicina forense. Pero un método altamente especializado conocido como: secuenciación mitocondrial está comenzando a ser más utilizado en este campo. Por medio de esta técnica se pudo identificar un cabello de Napoleón y a los miembros de la familia Romanoff (Coleman y Sweson, 1994).

Saliva

El ADN puede ser tipificado a partir de saliva depositada en la solapa de los sobres o en estampillas, como se hizo en el bombardeo al Centro Internacional del Comercio de Nueva York en 1993. El ADN puede también ser extraído de las colillas de cigarrillos encontradas en la escena del crimen, y también en copas, botellas, bocina de teléfonos y mordeduras (Coleman y Sweson, 1994).

Métodos de extracción de ADN

Existen varios métodos para la extracción del ADN, dentro de los cuales se incluyen las extracciones con resina Chelex 100, extracciones orgánicas (fenol/cloroformo/alcohol isoamilico), y el uso de Centricon 100. Estos métodos permiten el aislamiento y la purificación del ADN de las muestras a ser analizadas. Por otra parte, la mayoría de los componentes celulares que no son ADN (componentes orgánicos) son removidos para evitar inhibición de los componentes de la reacción, como la polimerasa Taq, la cual es crucial en los métodos de análisis del ADN como la PCR.

Luego que el ADN ha sido extraído y purificado, éste es concentrado y probado para determinar su cantidad y calidad. Si el ADN es obtenido en grandes cantidades es posible realizar la técnica de RFLP, porque esta técnica así lo requiere. Pero, si se han obtenido cantidades pequeñas de ADN y además se encuentra degradado, la prueba más conveniente a realizar es la PCR.

Método de extracción por Chelex

El Chelex 100 es un medio que incrementa la señal de la amplificación del PCR de pequeñas cantidades de ADN liberadas por un pequeño número de células que han sido hervidas en el proceso de extracción. Chelex 100 es una resina quelante que tiene una alta afinidad por iones metálicos polivalentes. Ésta está compuesta de co-polímeros de estireno divinil-benceno que contienen iones iminodiacetato pareados, los cuales actúan como iones quelantes. Se conoce que la presencia de Chelex 100, durante el calentamiento en el proceso de extracción, previene la degradación del ADN al quelar los iones metálicos que pueden actuar como catalistas en la destrucción del mismo a altas temperaturas en soluciones de bajo potencial iónico (Walsh y col, 1991).

Método de extracción por Centricon 100

Este es un procedimiento mediante el cual las células contenidas en la muestra a analizar son lisadas al ser incubadas en un buffer de extracción contenedor de Proteinasa K, para liberar el ADN. El ADN es posteriormente separado de los componentes orgánicos de la célula mediante el uso de un reactivo que contiene Fenol, Cloroformo y Alcohol Isoamílico en proporción 25:24:1, respectivamente. Este reactivo permite colocar al ADN en una fase acuosa. Esta es posteriormente transferida a un microtubo de concentración Centricon 100

y sometida a varios ciclos de centrifugación para purificar el ADN, el cual queda adherido a la columna del tubo Centricon 100. Finalmente se realiza una última centrifugación con la columna invertida para recuperar el ADN extraído (Hochmeister y col, 1995).

Método de extracción orgánica

En este método, el ADN es extraído mediante lisis celular y separado de los componentes orgánicos de la célula en una fase acuosa, mediante el uso del reactivo Fenol, Cloroformo y Alcohol Isoamílico, como se mencionó anteriormente. Luego, la fase acuosa es transferida a un tubo nuevo de 1.5 ml y el ADN es precipitado con alcohol frío al 100%, seguido por un lavado con alcohol al 70%. Finalmente, el ADN es solubilizado en agua estéril (Hochmeister y col, 1995).

Métodos de análisis del ADN

Las dos técnicas más frecuentemente utilizadas para el análisis del ADN en ciencia forense son la técnica de Polimorfismos en la Longitud de los fragmentos de Restricción (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) y la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction, PCR*).

Polimorfismos en la Longitud de los fragmentos de Restricción (RFLP)

El procedimiento básico de la técnica RFLP es conocido como "Southern Blotting" por Edward Southern, el bioquímico escocés que desarrollara la técnica a comienzos de 1970. La tipificación del ADN mediante la técnica de RFLP consiste en un procedimiento que, mediante el uso de enzimas de restricción, corta el ADN y separa por tamaño las piezas de ADN cortadas mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. El ADN es transferido del gel a un soporte sólido

do como una membrana de nylon. Posteriormente se localizan y visualizan las **bandas de ADN** de interés mediante el uso de una sonda de ADN que puede estar marcada con un material radiactivo o fluorescente. Si la sonda ha reconocido su secuencia complementaria, ésta emitirá una señal que finalmente será detectada al ser expuesta a una filmina de radiografía. Los patrones de bandas de ADN obtenidos son leídos e interpretados para proceder a la realización de la determinación de las frecuencias alélicas y demás análisis de genética poblacional (Coleman y Sweson, 1994) (Ilustración 2).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de Reacción de la Polimerasa en Cadena es usada para analizar pequeñas cantidades de ADN provenientes de muestras de *casos forensicos*. Esta técnica fue inventada en 1984 por Kary Mullis de la corporación Cetus y desde entonces ha tenido un uso muy amplio desde el diagnóstico de enfermedades genéticas hasta la detección bacteriana (Mullis y Faloona, 1987; Saiki y col, 1985).

La reacción de PCR tiene su fundamento en la presencia de dos cebadores cortos, cada uno de ellos complementarios a la secuencia de ADN flanqueante de la región a ser amplificada. Estos cebadores se extienden por la acción de una enzima ADN polimerasa termoestable (polimerasa Taq) con capacidad de mantener su estabilidad a altas temperaturas. En general, estas polimerasas realizan su trabajo a 68 - 74°C.

La nueva molécula de ADN, que se compone de una *cadena modelo* y otra *neosintetizada*, es luego desnaturalizada a altas temperaturas. Ahora se permite que los cebadores se anexen nuevamente y otra vez la enzima ADN polimerasa Taq realizará una nueva síntesis.

Esta serie de desnaturalizaciones/apariamientos/extensiones se realiza en múltiples ciclos lo que conlleva a una *amplificación logarítmica* de la secuencia de ADN objetivo (Ilustración 3).

Marcadores moleculares para identificación humana

Los marcadores moleculares abarcan características hereditarias, las cuales diferencian a un individuo de otro. Pueden consistir desde rasgos físicos, como el color de la piel y de los ojos o el tipo de cabello, las diferencias demostrables entre diversos componentes sanguíneos, y las diferencias a nivel del ADN estudiadas mediante técnicas de polimorfismo en el número de repeticiones variable en tandem y repeticiones cortas en tandem. El valor de los primeros es muy limitado cuando se trata de resolver una paternidad o un caso forense. Los segundos se componen de múltiples marcadores identificables de una manera más reproducible, que se han convertido en la base de las consultas medicolegales para adjudicar la paternidad o, en caso criminal, la culpabilidad o la inocencia de un sospechoso.

Número de repeticiones variable en tandem (VNTR)

Este es un número de loci, el cual forma parte de un grupo de marcadores llamados Longitud del Fragmento de Polimorfismo Amplificado, AMP-FLP. Estos polimorfismos han sido extensivamente utilizados en análisis forense. Estos sitios polimórficos de ADN no codifican para una proteína en particular y, en general, no tienen un efecto conocido en el ser humano. Esta particularidad es una ventaja, porque significa que las VNTR podrían ser menos influenciadas por los procesos de selección natural, lo cual podría conllevar a diferentes frecuencias en diferentes poblaciones.

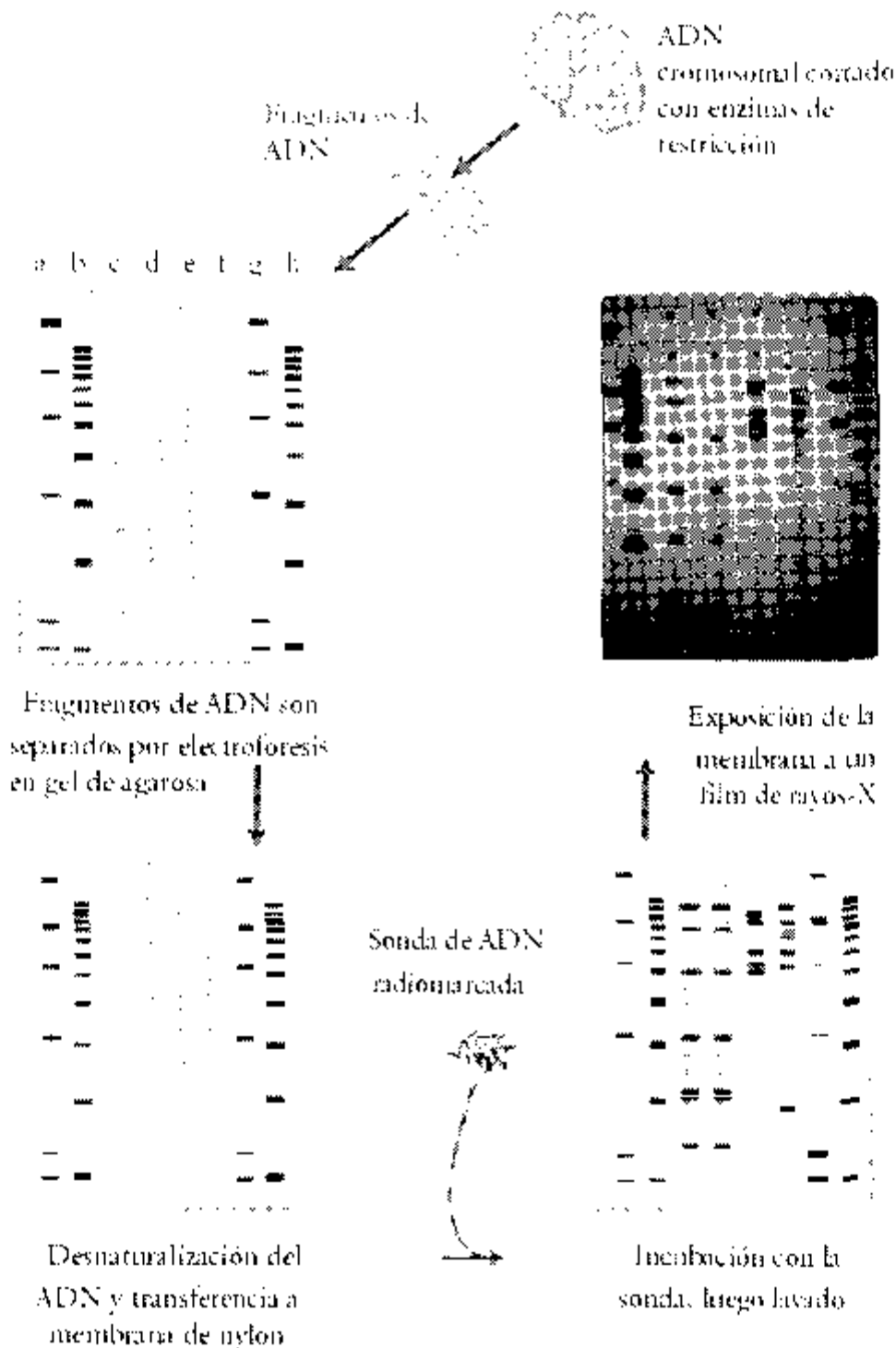


Ilustración 2. Diagrama de la Técnica de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción. En este diagrama se ilustra el procedimiento para el análisis de VNTR de ADN extraído de sangre total. Esta técnica ha sido una de las primeras utilizadas en estudios de identificación de ADN humano y utiliza enzimas de restricción para producir fragmentos de ADN, lo cuales son posteriormente separados por medio de electroforesis en gel de agarosa e incubados con una sonda de ADN marcada radiactivamente. Al final del proceso, los fragmentos reconocidos por la sonda de ADN serán observados en la exposición a un film de rayos X.

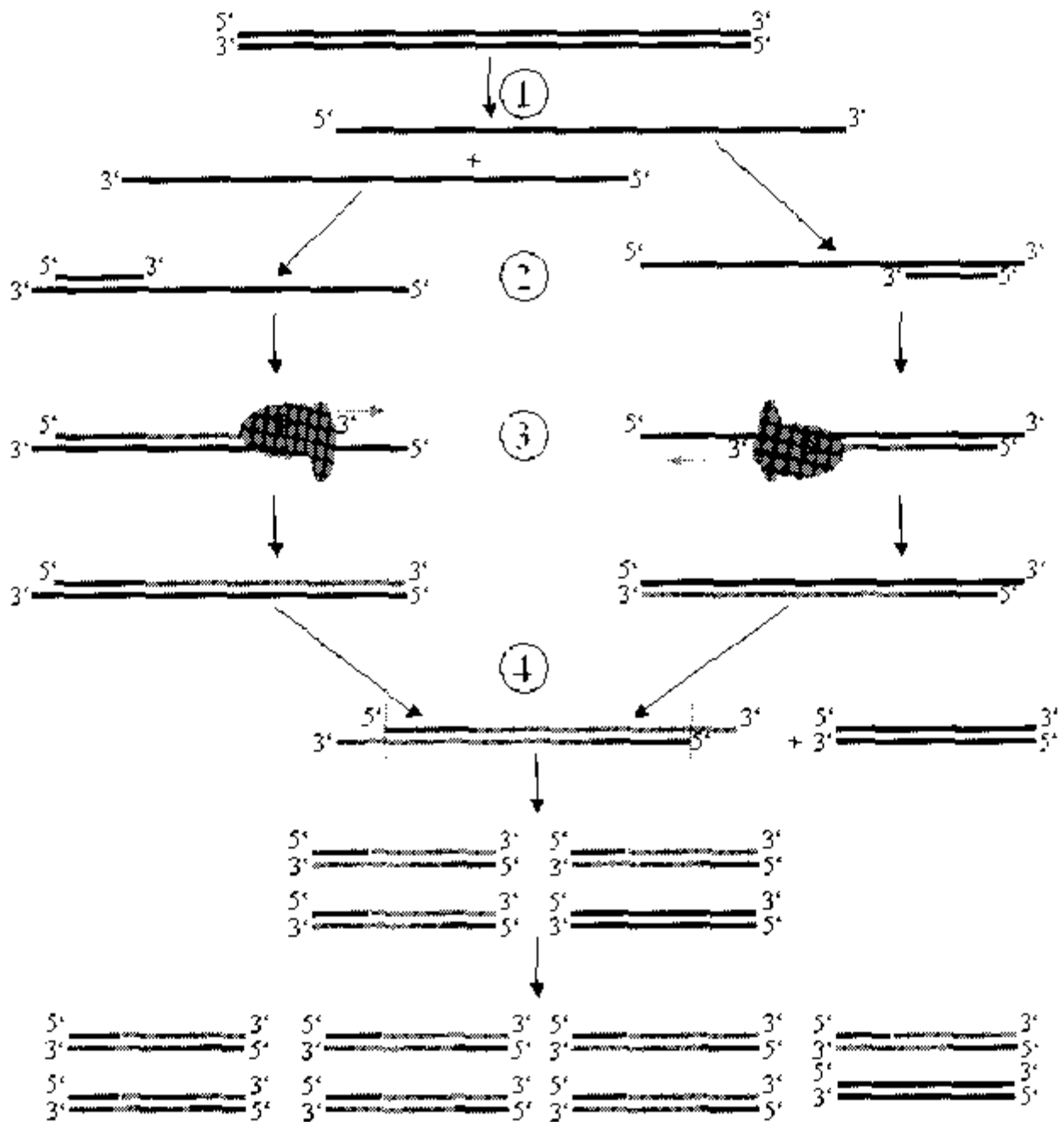


Ilustración 3. Reacción en Cadena de la Polímerasa (PCR). En esta técnica inicialmente ocurre el proceso de desnaturalización para separar la doble hebra de ADN en cadenas sencillas. Posteriormente procede al apareamiento de los cebadores para delimitar la región de ADN a ser amplificada y, finalmente, se realiza la extensión de los cebadores por una Polimerasa de ADN termoestable. Schematic drawing of the PCR

cycle. Esta ilustración se resume de la siguiente manera: (1) *desnaturalización* a 96°C. (2) *anexo de cebadores* a 68°C. (3) *Síntesis de la nueva hebra de ADN* a 72°C (P=Polimerasa). (4) El primer ciclo está completo. Las dos hebras de ADN resultante sirven de *AND molde* para el próximo ciclo de PCR, de manera que en cada ciclo se dobla la cantidad de ADN duplicado.

La tipificación de los sistemas AMP-FLP está basado en las diferencias de longitud. Uno de los marcadores más representativos y frecuentemente usados en ciencia forense es el locus D1S80, el cual se conoce como minisatélite debido a que este locus tiene repeticiones de dieciséis pares de bases. La amplificación y tipificación del locus D1S80 por PCR fueron descritas por primera vez por Kasai y colaboradores (Kasai y col, 1990; Nakamura y col, 1988). Estos investigadores proporcionaron información acerca de la secuencia del locus confirmando que el tamaño de la unidad repetitiva es de dieciséis pares de bases.

Posteriormente, Budowle y colaboradores describieron un sistema de electroforesis horizontal de alta resolución y proporcionaron datos poblacionales indicando que este marcador AMP-FLP* podría ser de gran utilidad para aplicaciones forenses. Hochmeister y colaboradores obtuvieron resultados confiables al tipificar D1S80 de restos humanos en descomposición, demostrando que las muestras que eran muy poco probables que dieran resultados por RFLP podían ser analizadas usando este marcador AMP-FLP (Budowle y col, 1991; Hochmeister y col, 1991; Cosso y Reynolds, 1995; Honda y col, 1995).

A la fecha se han realizado numerosos estudios de validación del locus D1S80 para su aplicación forense. Entre ellos se encuentra el estudio que determinó que los fluidos expuestos a cloro, ácidos y aceites eran capaces de ser amplificados por D1S80. Por otro lado, la presencia de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*, en sangre, no altera el patrón de genotipo. La tipificación del locus D1S80 ha sido también usada para la identi-

cación humana a partir de hueso compacto procedente de restos humanos (Baechtel y col, 1995).

Repeticiones cortas en tandem (STR)

Las repeticiones cortas concatenadas consisten de secuencias cortas de tres a siete pares de bases repetidas aleatoriamente, los que son conocidos como regiones microsátélites. Se ha estimado que el genoma humano puede contener al menos un STR trimérico o tetramérico por cada 20 kilobases. Cerca de la mitad de los locus STR estudiados por Edwards y colaboradores son polimórficos en cuanto al número de repeticiones. Esta característica es de mucha utilidad para realizar mapeo físico y genético del genoma humano, diagnóstico de enfermedades e identificación de personas en ciencias médicas y forenses. Los marcadores de repeticiones cortas concatenadas permiten analizar pequeñas cantidades de muestras biológicas. Una de las ventajas de estos marcadores es que siendo menores que los VNTR pueden ser más informativos cuando se dispone de ADN parcialmente degradado (Edwards y col, 1991; Edwards y col, 1992; Hammond y col, 1994; Lins y col, 1996; Walsh y col, 1996; Sprecher y col, 1996; Lins y col, 1998). Se han venido optimizando nuevos marcadores STR para su utilización en identificación humana, tal es el caso de los marcadores CSF1PO, TPOX, THO1, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820 y D13S317, los cuales han sido utilizados en las pruebas de identificación humana como en casos de paternidad, en la solución de casos de asesinos en serie. En la ilustración 4 se esquematiza un proceso rutinario de tipificación usando STR. En el cuadro 1 se presentan las características de los marcadores STR usados en este estudio.

* Del inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism AMP-FLP*.

Pasos en el Procesamiento de Muestras por STR

Muestra Obtenida de
Escena del Crimen o
Investigación de Poternidad

STR

Biología



Tecnología

Separación y Detección de
Productos de PCR
(Alelos STR)



Determinación
de Genotipos de
la Muestra

Genética

Comparación de los
Genotipos de la Muestra
con los Resultados de
Otras Muestras

Generación del Reporte
del Caso con la
Probabilidad de
Coincidencia Aleatoria

Si ocurre una coincidencia, se
compara el perfil de ADN de
la muestra con la base de
datos de la población

Ilustración 4. En este diagrama se esquematiza el análisis de muestras de sangre total con los marcadores STR. Una vez que se ha extraído el ADN de las células nucleadas de la sangre, éste es purificado, cuantificado y amplificado usando los marcadores CTT, FFv y DDD. Posteriormente, el producto de ampli-

ficación es separado mediante el uso de electroforesis en geles de acrilamida y el ADN es teñido con Nitrato de Plata para determinar el genotipo de cada muestra. Al final, se realiza la asignación alélica de manera visual y se procede a realizar los análisis estadísticos.

Cuadro I

Características de los marcadores STR utilizados en este estudio

Locus STR	Localización cromosomal	Definición del locus por GenBank®	Secuencia repetitiva 5' → 3'
CSF1PO	5q33.3-34	HUMCSF1PO, proto-oncogen e-fms para el gen receptor CSF-1 humano	AGAT
TPOX	2p25.1-pter	HUMTPOX, gene de la peroxidasa de la tiroide humana	AATG
TH01	11p15.5	HUMTH01, gene de la hidroxilasa de la tiroxina humana	AATG
F13A01	6p24.3-p25.1	HUMF13A01, subunidad del gen de l factor 13 de la coagulación humana	AAAG
FESFPS	15q25-qter	HUMFESFPS, proto-oncogen e-fes/fps humano	AAAT
VWA (otrora vWA)	12p12-pter	HUMVWFA31, gene del factor von Willebrand humano	AGAT
D16S539	16q24-qter	NA	AGAT
D7S820	7q11.21-22	NA	AGAT
D13S317	13q22-q31	NA	AGAT

Estos marcadores pueden tipificar muestras procedentes de tejidos post-mortem, los que se encuentran altamente deteriorados. De esta manera se han convertido en una herramienta valiosa en investigación criminal (Andersen y col, 1996; Chackraborty y col, 1999; Tracey, 2001; Hoehmeister, 1997; Off-Olsen y col. 2001; Bille, 1999).

Bases de datos de ADN

Las bases de datos de ADN están constituidas por las frecuencias de los perfiles genéticos de muestras seleccionadas de una población en particular. Las bases de datos pueden provenir de diferentes fuentes tales como: bancos de sangre, laboratorios de estudios de paternidad, personal de laboratorio, clientes en centros de consejo genético y personas

inculpadas de algún crimen. Estas muestras son apropiadas para usos forenses principalmente, porque los loci usados para identificación son usualmente partes no funcionales de genes y por lo tanto es imposible que sean correlacionados con cualquier rasgo físico o del comportamiento que estén asociados con diferentes subgrupos de la población.

Análisis estadístico en tipificación humana por ADN

El análisis estadístico de los resultados de tipificación humana por ADN es fundamental para la interpretación y uso de los mismos. Para realizar la construcción de una base de datos que refleje las frecuencias alélicas en una población se requiere de la previa determinación de parámetros tales como: frecuen-

cias alélicas, el equilibrio de Hardy-Weinberg, la probabilidad de coincidencia, el poder de discriminación, el poder de exclusión y el índice típico de paternidad.

Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas juegan un rol muy importante en genética de poblaciones al igual que la frecuencia de los genotipos porque son el soporte de las bases de datos de ADN, las que son de fundamentales para estudios de paternidad o investigaciones forenses. La frecuencia alélica puede ser expresada de la siguiente manera: para los alelos expresados por i , la proporción p_i , para un gen con un número arbitrario de alelos es

$$p_i = F_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} F_{ij}$$

Donde el término $\sum_{j \neq i}$ significa que suman todos los valores j que difieren de i . Este es el caso de todos los heterocigotos que contienen un alelo A_i . (Nacional Research Council, 1996; Huston, 1998; Gillespie, 1998; Farley y Harrington, 1991)

Ley de Hardy-Weinberg

La ley describe los estados de equilibrio de los loci sencillos en una población diploide que se aparee al azar, la que a su vez se encuentra exenta de otras fuerzas evolutivas tales como mutación, migración y variación genética. Esta ley también indica que una población en equilibrio exhibe la misma frecuencia de genotipos de una generación a otra y que los alelos encontrados en un locus no muestran correlación *a priori*, lo que muestra que existe una independencia entre alelos y la manera en que estos son transmitidos de una persona a otra.

La derivación de la fórmula para un locus en particular toma muchos pasos, pero al fórmula final es:

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

donde

- p = frecuencia del alelo dominante en una población
- q = frecuencia del alelo recesivo en la población, y

Se han elaborado varias formulaciones y programas para estudiar el equilibrio de Hardy-Weinberg y la independencia entre alelos en múltiples loci (Guo y Thompson, 1992; Hernández y Weir, 1989; Williams, 1976). La prueba comúnmente usada es la prueba exacta de Fisher, la que estudia la probabilidad de asociación no aleatoria entre alelos y ha sido incorporada en un programa de análisis poblacional llamado: Análisis de datos genéticos (del inglés: Genetic Data Analysis, GDA).

La fórmula utilizada en dicho programa para el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg en una población determinada es la siguiente:

$$\Pr(\{n_g\}|\{n_a\}) = \frac{n! 2^H \prod_a n_a!}{(2n)! \prod_g n_g!}$$

Aquí g representa los genotipos, a los alelos, H el número de individuos heterocigotos, $\{ng\}$ la colección de genotipos contados y $\{na\}$ la colección de alelos contados (Nacional Research Council, 1996; Huston, 1998; Gillespie, 1998; Farley y Harrington, 1991; Zaykin y col, 1995). Es importante determinar el equilibrio de la ley de Hardy - Weinberg en

una población para saber si la frecuencia alélica de un gen en particular se mantiene estable de una generación a otra. La estabilidad en la ocurrencia de las frecuencias alélicas en una población permitirá disminuir las posibilidades de error al determinar parámetros de genética poblacional aplicados a estudios de paternidad e investigación forense.

Probabilidad de coincidencia

Se define como el número de individuos que deben ser estudiados para encontrar el mismo patrón de ADN en un individuo seleccionado al azar. La probabilidad de coincidencia está representada por la siguiente fórmula:

$$pM = \sum_{i=1}^n \sum_{j \geq 1} P_{ij}^2$$

Donde i y j representan las frecuencias de todos los posibles alelos en n número de muestra. P_{ij} representa las frecuencias de todos los posibles genotipos (Nacional Research Council, 1996; Huston, 1998; Gillespie, 1998; Farley y Harrington, 1991).

Poder de discriminación

Está definido como la probabilidad que tendrían dos individuos elegidos al azar de coincidir en una serie de genotipos dados. El poder de discriminación está determinado como uno menos la probabilidad de coincidencia. Para determinar el poder de discriminación combinado de varios locus se sustrae de uno los productos del poder de discriminación individual de cada locus. Esto se puede expresar usando la siguiente fórmula (Nacional Research Council, 1996; Huston, 1998; Gillespie, 1998; Farley y Harrington, 1991):

$$P_{\text{discriminación}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - P_{di})$$

Poder de exclusión

Está definido como la fracción de individuos que tienen un perfil de ADN diferente de aquel procedente de un individuo seleccionado al azar al momento de realizar un análisis de identificación humana por ADN, por ejemplo, en un caso de paternidad. El poder de exclusión es representado por la siguiente fórmula:

$$PE = h^2(1 - 2hH^2)$$

Donde h es la frecuencia de homocigotos y H la frecuencia de heterocigotos.

Para determinar el poder de exclusión combinado de varios locus se sustrae de uno el producto de uno menos el poder de exclusión individual de cada locus. Esto se puede expresar en la siguiente fórmula (Nacional Research Council, 1996; Huston, 1998; Gillespie, 1998; Farley y Harrington, 1991):

$$PE_{\text{combinado}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PE_i)$$

Índice típico de paternidad

Éste refleja cuántas veces es más probable que la persona que es sometida a un estudio de paternidad sea el padre biológico, en comparación con una persona seleccionada al azar. El índice típico de paternidad se puede expresar mediante la siguiente fórmula:

$$PI_{\text{típico}} = \frac{1}{2H}$$

El índice típico de paternidad de varios locus es el producto del índice típico de paternidad de cada locus (Nacional Research Council, 1996; Huston, 1998; Gillespie, 1998; Farley y Harrington, 1991).

II. Objetivos

Objetivo general del estudio

Con este proyecto nos propusimos establecer una base de datos consistente de las frecuencias alélicas para la población nicaragüense, usando los marcadores Longitud del Fragmento de Polimorfismo Amplificado (AMP-FLP) AmpliFLP™ D1S80 y los Sistemas de Repeticiones Cortas Concatenadas (STR) *GenePrint*™ CSF1PO, TPOX, THO1 (CTT); F13A01, FESFPS, vWA (FFv) y D16S539, D7S820, D13S317 (DDD). La base de datos de la población nicaragüense es un instrumento indispensable para el respaldo estadístico de determinación forense y de paternidad.

Objetivos específicos del estudio

- Establecer el uso de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el estudio de los marcadores moleculares indicados.
- Determinar las frecuencias alélicas de los marcadores moleculares menciona dos para la población nicaragüense.
- Determinar el porcentaje de heterocigotos y homocigotos, la probabilidad de igualdad, el poder de discriminación, el índice típico de paternidad y el poder de exclusión de los marcadores moleculares para la población nicaragüense.

III. Material y métodos

Muestras

Se recolectaron un total de 111 muestras de sangre de donantes procedentes de la Cruz Roja de Nicaragua. Los donantes no estaban emparentados entre sí y provenían de diversas regiones del país. Para cada muestra se recopiló la siguiente información: tipo sanguíneo y Rh, sexo, edad y origen de la persona de quien procede la muestra. Los donantes de sangre eran originarios de las ciudades de Managua, Matagalpa, León, Bonanza, Puerto Cabezas, Masaya, Jinotega, Madriz, Carazo y Chontales, lo que significa un muestreo aleatorio de diversos puntos del país. La información de cada donante fue manejada con estricta confidencialidad. Para ello se asignó un código a cada muestra, de manera que los donantes permanecieran en total anonimato. Al final del estudio se eliminó el material biológico.

Extracción de ADN de muestras de sangre

Para extraer el ADN de alto peso molecular de las muestras de sangre se usó la resina de Chelex®100 siguiendo el protocolo descrito previamente por Walsh (Walsh y col, 1991).

Cada muestra de sangre de 3 ml se adicionó a un tubo de microcentrífuga conteniendo agua desionizada. Se mezclaron y fueron incubadas a temperatura ambiente (~ 25°C) por treinta minutos. Se centrifugó a máxima velocidad (14,000 r.p.m.) en una microcentrífuga Eppendorf y, cuidadosamente, el sobrenadante fue removido dejando tan sólo el 3% del volumen inicial de la muestra, descartando el resto. Se adicionó Chelex 100 al 5% al sobrenadante.

Posteriormente se incubó a 56°C por veinte minutos y finalmente se agitó en vortex a alta velocidad. Se hirvió a 100°C y se agitó en vortex nuevamente. Se centrifugó a alta velocidad a temperatura ambiente en una microcentrífuga. El ADN se obtuvo en el sobrenadante, listo para amplificación por PCR. Las muestras de ADN fueron almacenadas a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento por PCR.

Análisis del ADN

La amplificación y la determinación de los alelos para los marcadores CTT y FFv fueron realizadas siguiendo los procedimientos estándar del paquete Gene Print System

(Silver Stain Detection) - Promega. La amplificación del ADN para la determinación de los alelos para el marcador D1S80 se realizó utilizando el sistema AmpliFLP™ D1S80 - Perkin Elmer. Este procedimiento se realizó para obtener el ADN de interés en cantidades suficientes para poder detectar una banda de ADN en geles de agarosa.

Marcadores CTT, FFv y DDD

Para la amplificación del ADN con enzima polimerasa AmplitaqGold® se usó un programa computarizado del Termociclador GeneAmp PCR System 2700 de Perkin Elmer. Para cada marcador se indican los ciclos de amplificación.

CTT:	95°C – 11 minutos	} 10 ciclos	90°C – 1 minuto	} 20 ciclos
	96°C – 2 minutos		64°C – 1 minuto	
	94°C – 1 minuto		70°C – 1.5 minutos	
	64°C – 1 minuto		4°C - ∞	
	70°C – 1.5 minutos			
FFv:	95°C – 11 minutos	} 10 ciclos	90°C – 1 minuto	} 20 ciclos
	96°C – 2 minutos		60°C – 1 minuto	
	94°C – 1 minuto		70°C – 1.5 minutos	
	60°C – 1 minuto		60°C – 30 minutos	
	70°C – 1.5 minutos		4°C - ∞	
DDD:	95°C – 11 minutos	} 10 ciclos	90°C – 1 minuto	} 20 ciclos
	96°C – 2 minutos		60°C – 1 minuto	
	94°C – 1 minuto		70°C – 1.5 minutos	
	60°C – 1 minuto		60°C – 30 minutos	
	70°C – 1.5 minutos		4°C - ∞	

Preparación de la reacción de PCR

La mezcla de reacción para PCR, ya sea para los marcadores CTT ó FFv, consistía de agua estéril, bufer 10X STR, mezcla de cebadores SRT 10X (CTT o FFv), Polimerasa Amplitaq Gold[®] (a 5u/ul) y muestra de ADN.

La concentración de ADN utilizada para amplificar, en el caso del marcador CTT, fue entre 1 y 5 ng; para el marcador FFv, la concentración

de las muestras fue entre 5 y 10ng. Como control positivo se utilizó ADN K562, el cual *amplifica alelos conocidos de cada locus*. Como control negativo se utilizó agua estéril en sustitución de la muestra de ADN para ambos marcadores.

En el cuadro 2 se muestran los patrones esperados del control positivo (ADN K562) para los marcadores CTT, FFv y DDD.

Cuadro 2
Patrones alélicos del control positivo ADN K567

CTT triple	Tamaño alélico	FFv triple	Tamaño alélico	DDD triple	Tamaño alélico
CSF1PO	10,9	F13A01	5,4	D16S539	12,11
TPOX	9,8	FESFPS	12,10	D7S820	11,9
TH01	9,3,9,3	vWA	16,16	D13S317	8,8

La asignación alélica se realizó por medio de marcadores moleculares que contienen los patrones de las bandas de ADN correspondientes a los alelos de los marcadores CTT, FFv y DDD. En el cuadro 3 el contenido alélico de

cada marcador molecular. Estos marcadores se colocan a la par de las muestras experimentales en el gel de acrilamida.

Cuadro 3
Contenido alélico de los marcadores moleculares CTT, FFv y DDD

CTT triple	Marcador molecular	FFv triple	Marcador Molecular	DDD triple	Marcador Molecular
CSF1PO	7 - 15	F13A01	4 - 16	D16S539	5 - 15
TPOX	6 - 13	FESFPS	7 - 14	D7S820	6 - 14
TH01	5 - 11	vWA	13 - 20	D13S317	7 - 15

Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la amplificación del ADN de interés experimental, los productos de la PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%.

La agarosa se disolvió completamente por calentamiento usando un horno de microondas. Posteriormente se dejó enfriar hasta

siones siguientes: 17 cm de ancho, 32 cm de largo y 0.4 cm de espesor, en el aparato de gel de secuenciación GIBCO BRL SA32.

Las placas de vidrio se ensamblaron poniendo el espaciador de 0.4 mm a los lados y entre cada vidrio usando pensadores para sostener los vidrios en su lugar. Se preparó una solución de acrilamida al 6% para un total de 75 ml mezclando los reactivos indicados en el cuadro 4.

Cuadro 4
Componentes del Gel de poliacrilamida

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Urea	31.50g	7M
Agua deionizada	36.25 ml	-
TBE 10X	3.75 ml	0.5X
Acrilamida 40% (19:1)	11.25 ml	4% o 6%
Volumen total	75ml	

alcanzar una temperatura de 55°C, para luego adicionar Bromuro de Etidio antes de verterlo en el molde del gel. Se insertaron los peines, para dar forma a los pozos en los cuales luego se pondrían las muestras de ADN y se le dejó solidificar por unos 20-30 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon para su corrida en electroforesis de gel de agarosa mezclándolas con solución cargadora al 5X conteniendo glicerol, EDTA y azul bromofenol. Una vez polimerizado, el gel fue transferido a una cámara de electroforesis, se adicionó el bufer de corrida (TBE 0.5X) hasta cubrir el gel por completo y las muestras fueron cargadas en los pozos del gel. Se seleccionó un voltaje de 5 voltios / cm y el gel se dejó correr por 2 horas. Finalmente se visualizó el gel usando un transiluminador ultravioleta de 302 nm, y se fotografió con una cámara digital para documentar el experimento.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para realizar la asignación alélica correspondiente a cada muestra se utilizó un gel de poliacrilamida desnaturalizante con las dimen-

La solución de acrilamida fue filtrada usando un filtro micron (Nalgene) y posteriormente transferida a un frasco con capacidad para 100 ml, se adicionó N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED) y Persulfato de amonio al 10% a la solución de poliacrilamida, los cuales inician el proceso de polimerización. Posteriormente, la solución de poliacrilamida fue vertida entre las placas de vidrio con ayuda de una jeringa de 20 ml y el gel se dejó reposar en posición horizontal para permitir su polimerización.

Se insertó un peine fino de 14 cm con capacidad para 49 pozos directamente en el gel y los vidrios fueron asegurados con 3 o más pensadores. El restante de poliacrilamida fue transferido a un tubo cónico desechable como control de polimerización. El gel se dejó reposar al menos por una hora a temperatura ambiente antes de pre-correr el gel y cargar las muestras.

Pre-corrida del gel de poliacrilamida

Una vez que el gel de poliacrilamida polimerizó se removieron los prensadores y las placas de vidrio fueron limpiadas con papel toalla satu-

rada de agua desionizada. El exceso de poli-acrilamida fue eliminado del peine y se adicionó TBE a 0.5X a la parte inferior de la cámara del aparato de electroforesis. Se sumergió el gel en el bufer, con la placa más grande hacia fuera, los vidrios se aseguraron al aparato de electroforesis y se adicionó TBE al 0.5X a la parte superior del aparato de electroforesis.

Finalmente, el gel de poli-acrilamida fue pre-corrido para que la superficie del mismo alcanzara una temperatura de 50°C. Para este procedimiento generalmente se usó entre 60 y 65 watts para un gel de poli-acrilamida de 40 cm, y entre 40 y 45 watts para un gel de 32 cm.

Preparación de las muestras

Las muestras amplificadas por PCR y el marcador de STR fueron mezclados con la solución cargadora del STR 2X para posteriormente ser cargadas en el gel. Para usar el marcador del alelo TH01 9.3, éste se mezcló con buffer STR 1X y con bufer cargador del STR 2X.

Cargado de las muestras

Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95°C y luego se mantuvieron por separado en hielo. Después de que el gel fue pre-corrido se usó una jeringa de 50-100 ml para remover el remanente de urea del área de los pozos, se insertó el peine en el gel y las muestras fueron cargadas en su respectivo pozo.

Electroforesis del gel de poli-acrilamida

Una vez que se completó el cargado de las muestras, el gel se corrió usando entre 60-65 Watts para un gel de poli-acrilamida de 40 cm, y entre 40 y 45 watts para un gel de 32 cm.

Tinción de plata

Después de finalizado el proceso de electroforesis, el peine y los espaciadores fueron removidos y las placas de vidrio fueron cuidadosamente separadas. El gel fue transferido a un contenedor plástico y se prosiguió con el protocolo de tinción de plata.

Una vez teñido el gel fue posado sobre una lámina de acetato y cubierto con una segunda lámina. Se le dejó secar a temperatura de 37°C por toda la noche y al día siguiente se realizaron las asignaciones alélicas de las muestras analizadas. El gel se fotografió con una cámara digital para documentar el experimento.

Marcador D1S80

Para la amplificación de ADN con respecto al marcador D1S80 se usó el siguiente programa:

95°C - 2 minutos	} 20 ciclos
95°C - 15 segundos	
66°C - 15 segundos	
72°C - 40 segundos	
72°C - 10 minutos	

Preparación de la reacción de PCR

Los componentes de la mezcla de reacción para PCR del marcador D1S80 fueron: Cloruro de Magnesio (5 mM), mezcla de reacción de PCR que contiene cebadores D1S80, Amplitaq[®] Gold, dATP, dGTP, dCTP y dTTP en bufer, y muestra de ADN.

La concentración de ADN para amplificar los alelos del marcador D1S80 estuvo entre 2.5 y 10ng. Como control positivo se utilizó ADN 3,

el cual amplifica los alelos 18 y 31. Como control negativo se utilizó agua desionizada y autoclavada.

La asignación alélica para el marcador D1S80 en las muestras se realizó utilizando un marcador estándar proporcionado por el fabricante del paquete. El rango de medición alélica del marcador va desde el alelo 15 hasta el 41.

Gel de poliacrilamida para el análisis del locus D1S80

Para el análisis de los productos de amplificación se utilizó el gel GeneAmp® Detection Gel High Resolution Gel Concentrate para realizar electroforesis vertical, la corrida del gel se realizó a 1000 voltios por 2 horas y 15 minutos. Posteriormente, el gel fue teñido utilizando la técnica de tinción de plata y las bandas alélicas fueron observadas en un transiluminador de luz visible según se detalló anteriormente. Finalmente, el gel se fotografió con una cámara digital para documentar el experimento (AmpliFLP™ D1S80 - Perkin Elmer Technical Manual).

Análisis estadístico de los resultados

Los genotipos de cada muestra estudiada usando los marcadores CSF1PO, TPOX, THO1, F13A01, FESFPS, vWA y D1S80 fueron organizados en una tabla de Excel y posteriormente analizados estadísticamente realizando las siguientes determinaciones: frecuencias alélicas, porcentaje de homocigotos y heterocigotos, equilibrio de Hardy-Weinberg, probabilidad de coincidencia, poder de discriminación, poder de exclusión e índice típico de paternidad.

Estos análisis fueron realizados con ayuda de los programas *PowerStats* (Tereba, 1999) de la corporación Prómega y *Genetic Data Analysis (GDA)* proporcionado muy amablemente por los doctores Paul Lewis y Dimitriv

Zaykin de la universidad del estado de Carolina del Norte (Lewis y Zaykin, 2001).

IV. Resultados experimentales

Se amplificaron 111 muestras de ADN por PCR y se definieron los perfiles de todas las muestras para los marcadores CSF1PO, TPOX, THO1, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820, D13S217 y D1S80. Todos los productos de PCR mostraron bandas visibles en geles de agarosa. Estos se separaron por medio de geles de acrilamida y se determinaron los alelos correspondientes.

Frecuencias alélicas

Los alelos más frecuentes para el locus CSF1PO son 10, 11 y 12 (ilustración 5), TPOX son 8, 9 y 11 (ilustración 6), THO1 son 6, 7 y 9.3 (ilustración 7), F13A01 son 3.2, 5, 6 y 7 (ilustración 8), FESFPS son 10, 11 y 12 (ilustración 9), vWA son 15, 16, 17 y 18 (ilustración 10), D16S539 son 9, 10, 11 y 12 (ilustración 11), D7S820 son 10, 11 y 12 (ilustración 12), D13S317 son 9, 10, 11 y 12 (ilustración 13), D1S80 (18, 24 y 25) (ilustración 14). En la ilustración 15 se aprecia el análisis de 20 muestras con el marcador CTT, los alelos de mayor frecuencia y sus controles negativo y positivo que amplifica para alelos conocidos de cada locus (CSF1PO alelos 9, 10; TPOX alelos 8, 9 y vWA alelo 9.3). En la ilustración 16 se muestran los perfiles genéticos de veinte muestras que han sido analizadas por el marcador FFv, el control negativo y el control positivo que amplifica para alelos conocidos de cada locus (F13A01 alelos 4, 5; FESFPS alelos 10, 12 y vWA alelo 16). En la ilustración 17 se aprecian los perfiles genéticos de catorce muestras analizadas por el marcador DDD donde se observan los alelos de mayor frecuencia. En la ilustración 18 se muestran los perfiles genéticos obtenidos con el marcador D1S80.

Frecuencia alélicas para el locus CSF1PO

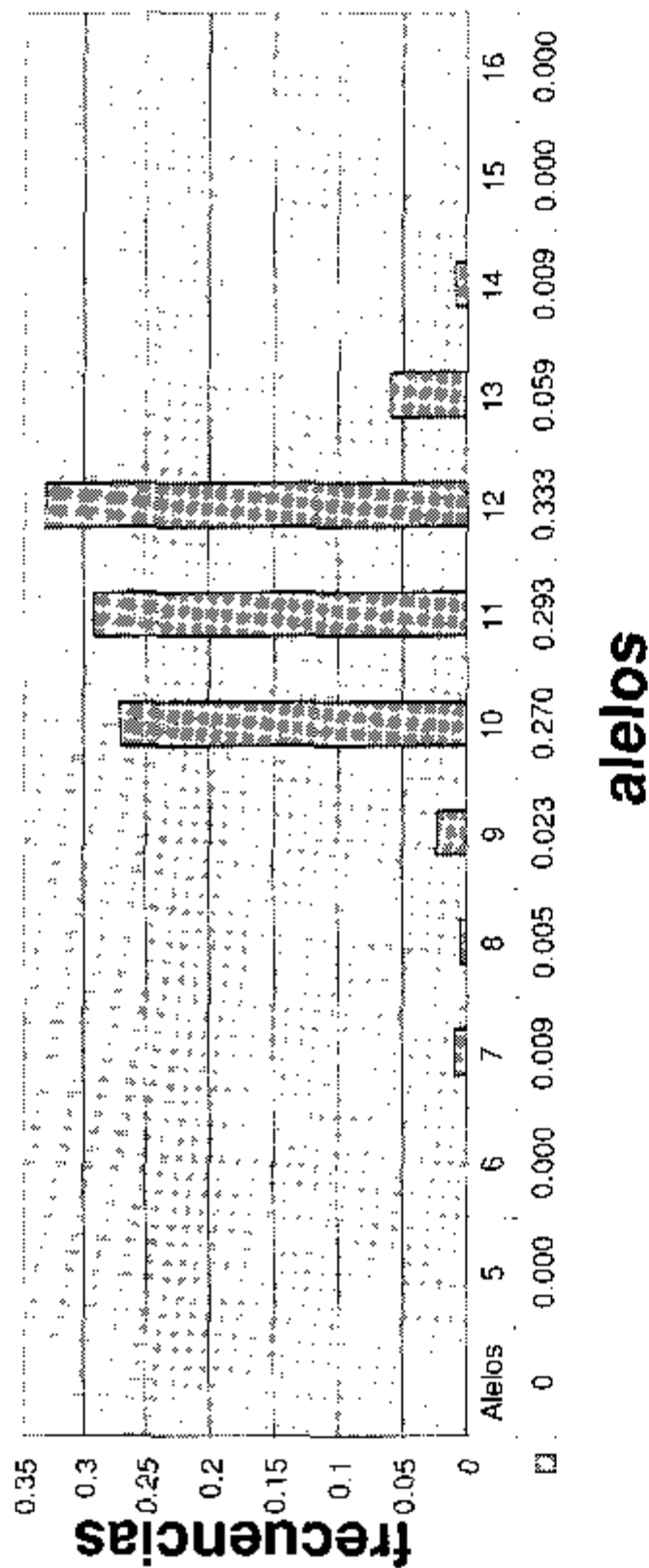


Ilustración 5. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus CSF1PO, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 10, 11 y 12.

Frecuencias alélicas para el locus TPOX

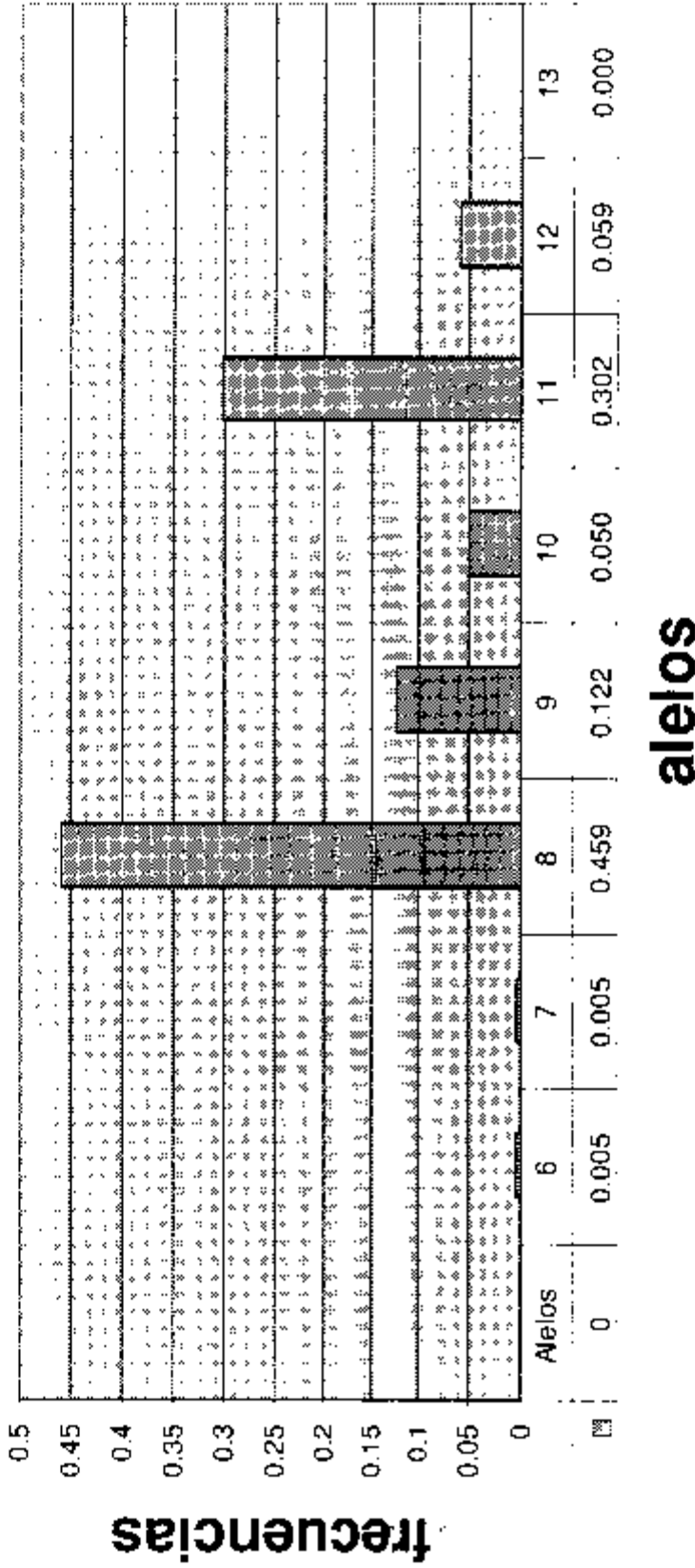


Ilustración 6. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus TPOX, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 8, 9 y 11.

Frecuencias alélicas para el locus THO1

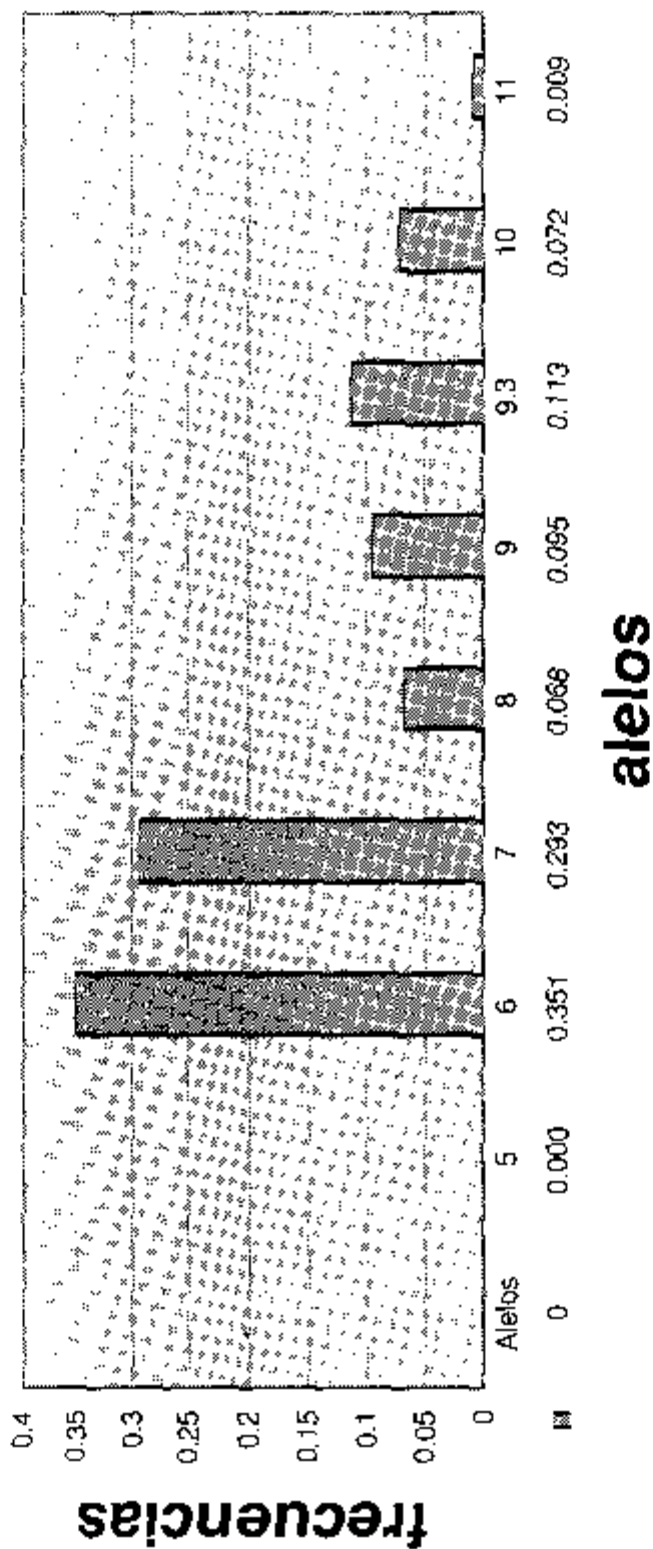


Ilustración 7. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus THO1, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 6, 7 y 9.3.

Frecuencias alélicas para el locus F13A01

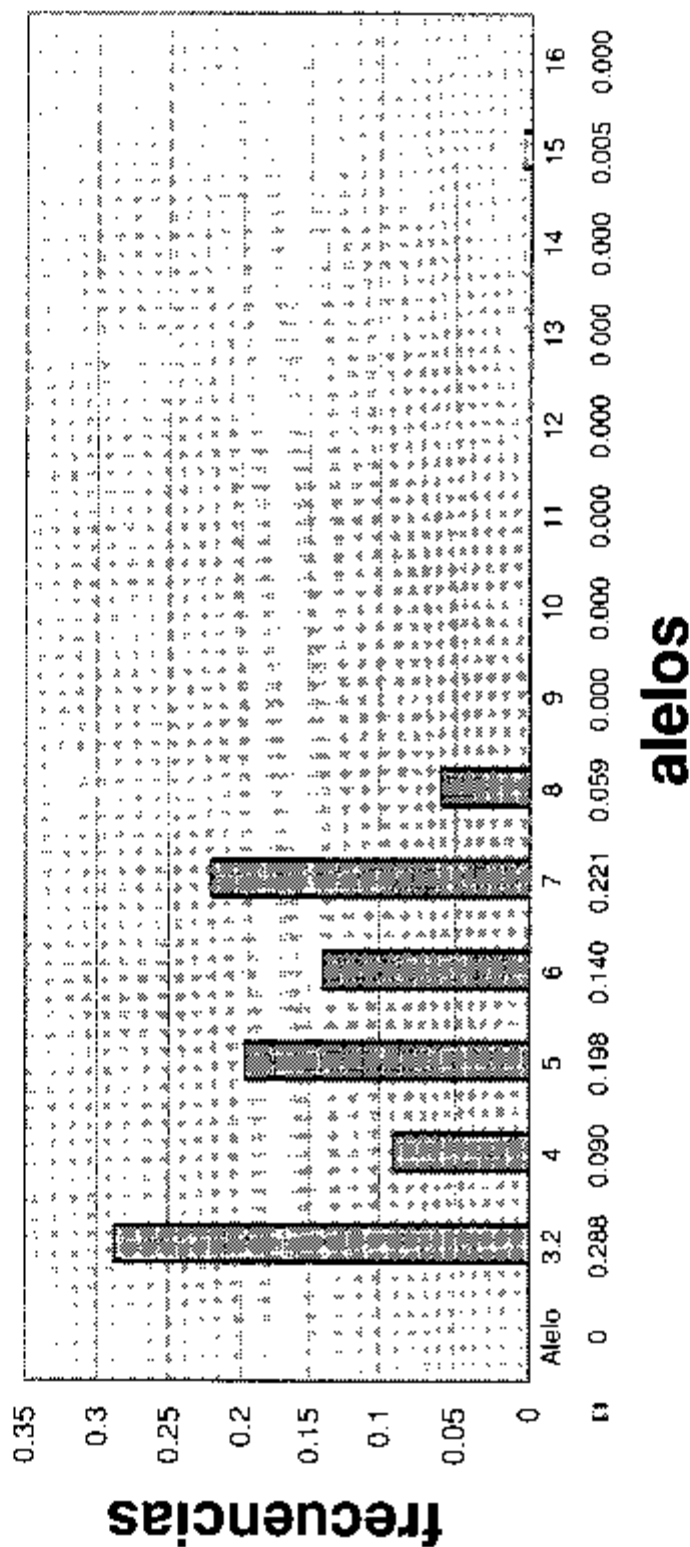


Ilustración 8. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus F13A01, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 3.2, 5, 6 y 7.

Frecuencias alélicas para el locus FESFPS

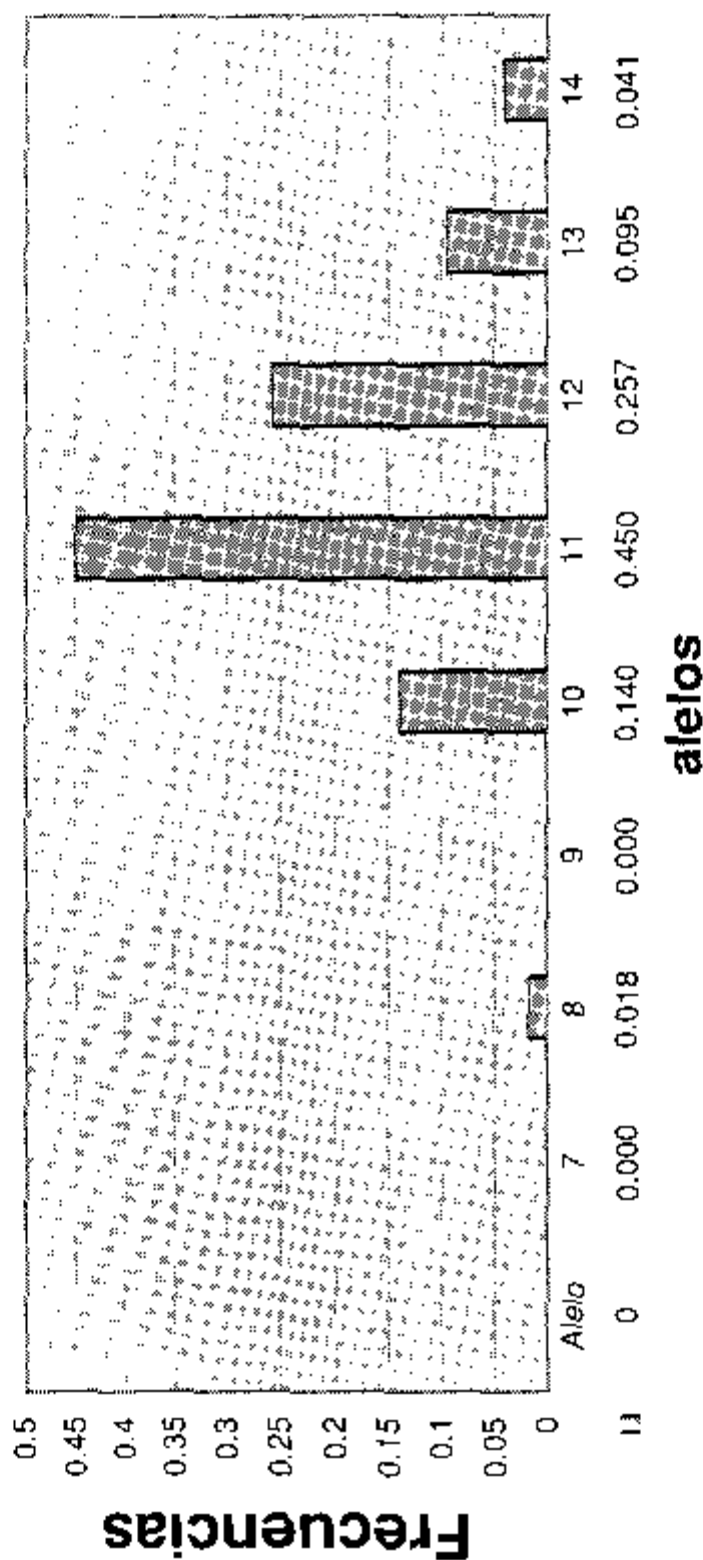


Ilustración 9. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus FESFPS, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 10, 11 y 12.

Frecuencias alélicas para el locus vWA

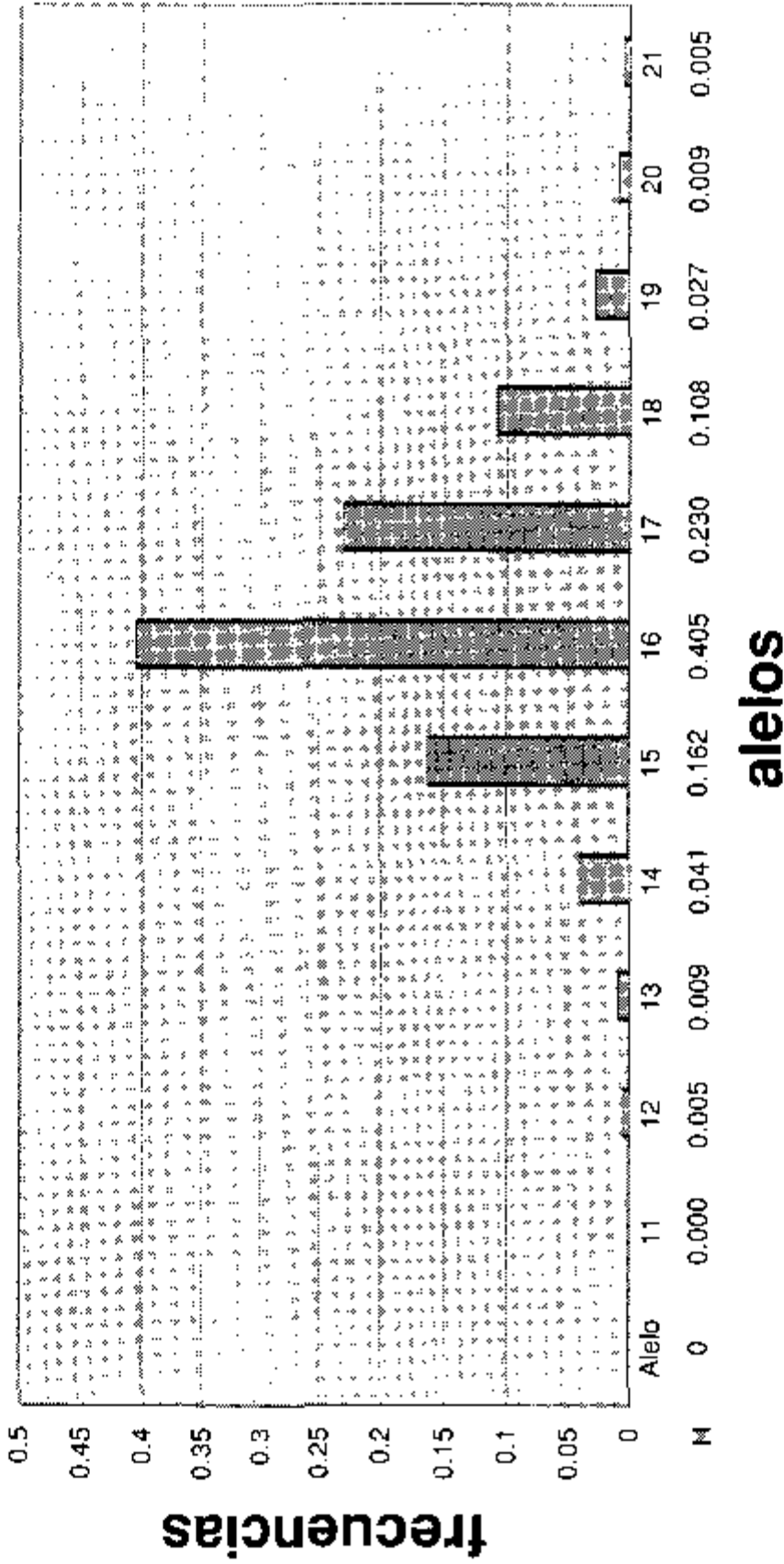


Ilustración 10. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus vWA, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 15, 16, 17 y 18.

Frecuencias alélicas para el locus D16S539

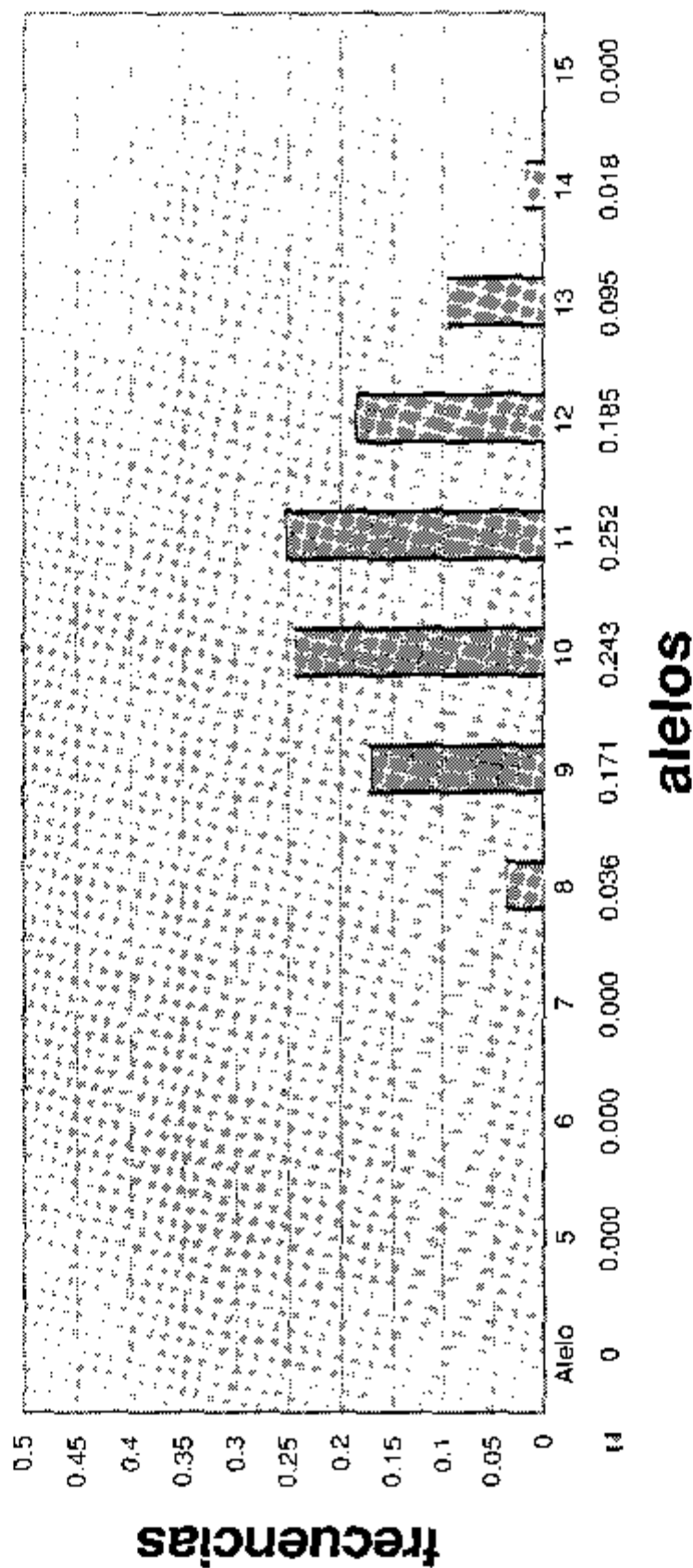


Ilustración 11. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus D16S539, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 9, 10, 11 Y 12.

Frecuencias alélicas para el locus D7S820

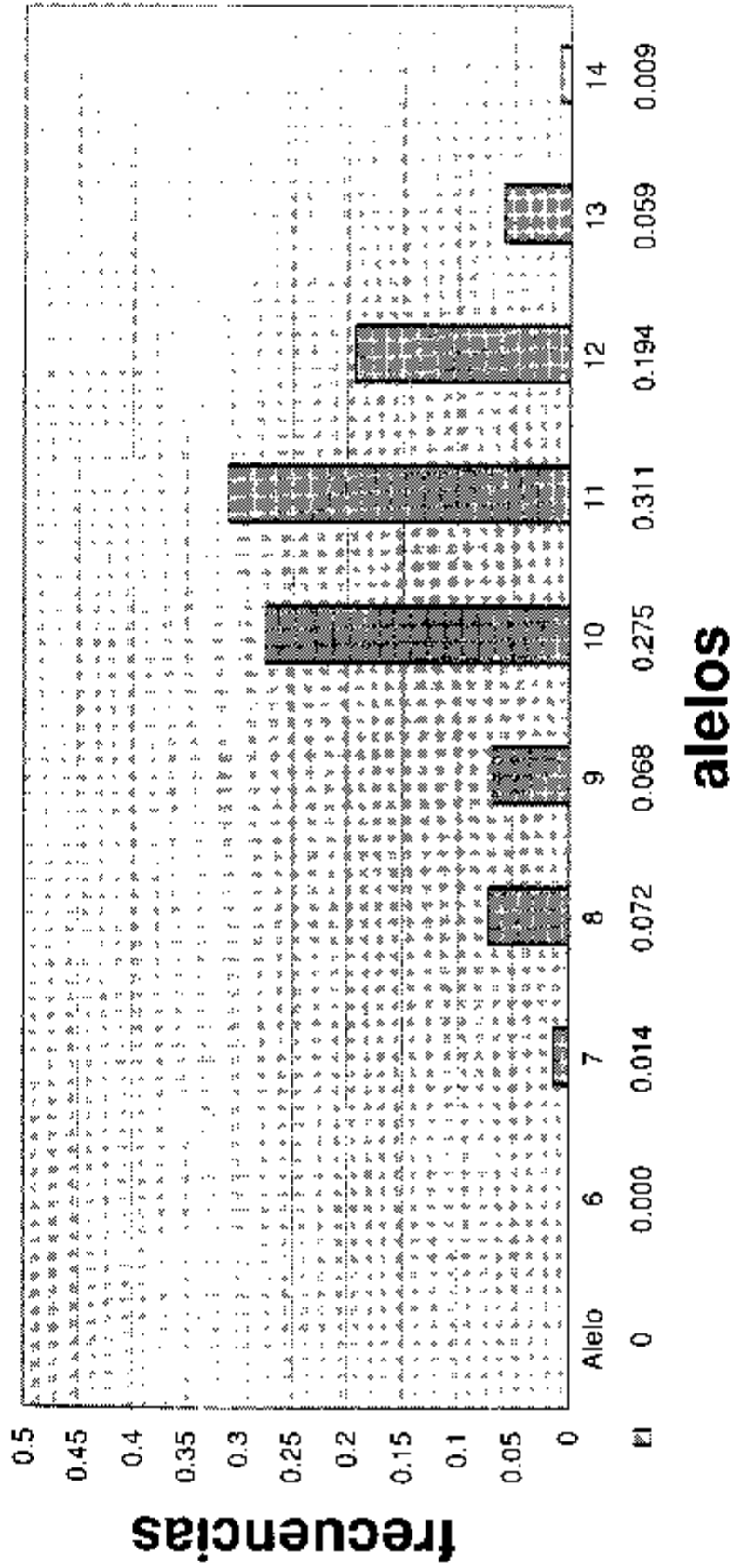


Ilustración 12. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus D7S820, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 10, 11 Y 12.

Frecuencias alélicas para el locus D13S317

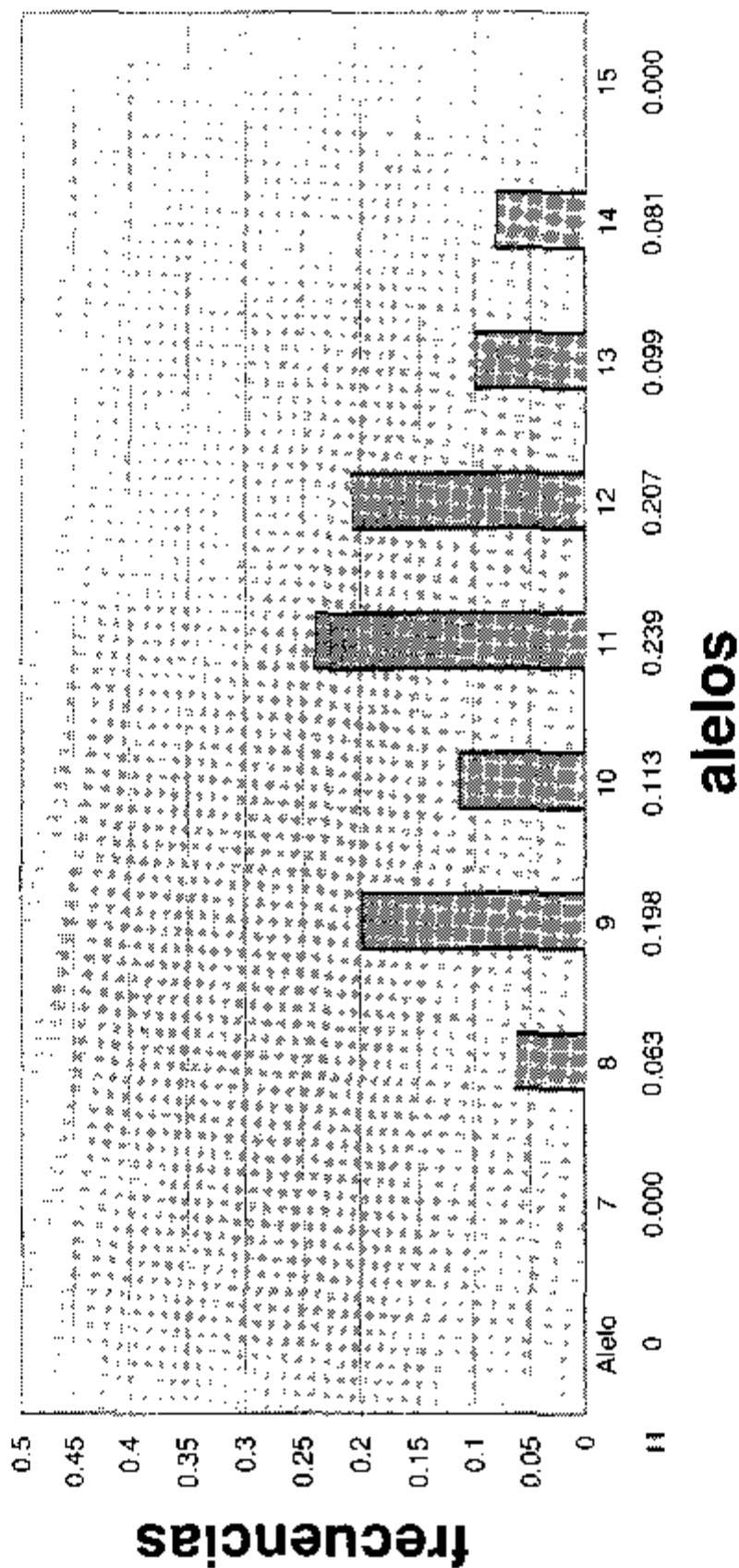


Ilustración 13. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus D13S317, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 9, 10, 11 y 12.

Frecuencias alélicas del locus D1S80

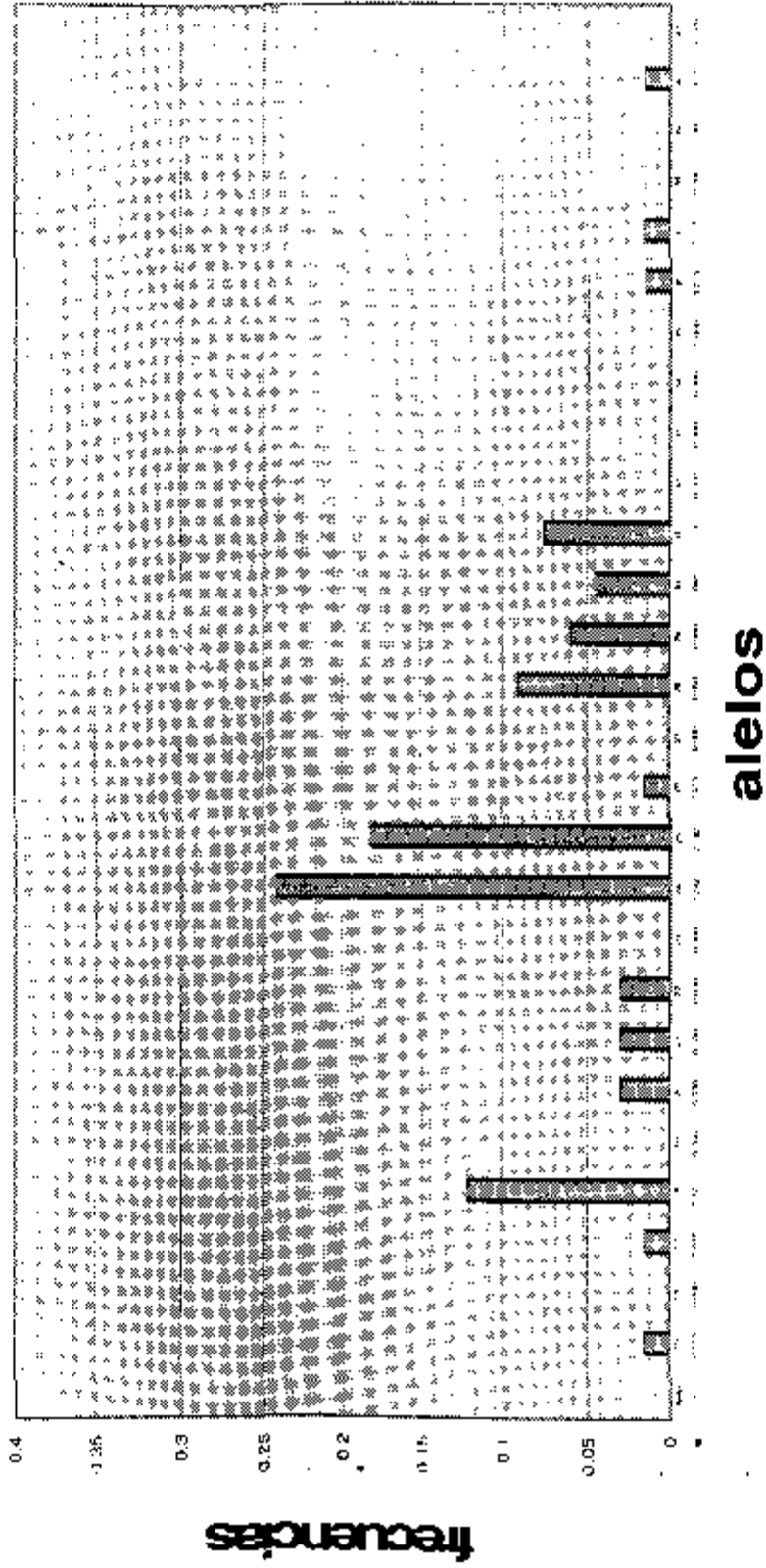


Ilustración 14. En este gráfico se presentan las frecuencias alélicas del locus D1S80, donde se observa que los alelos de mayor frecuencia son los alelos 18, 24 y 25.

Gel del marcador CTT

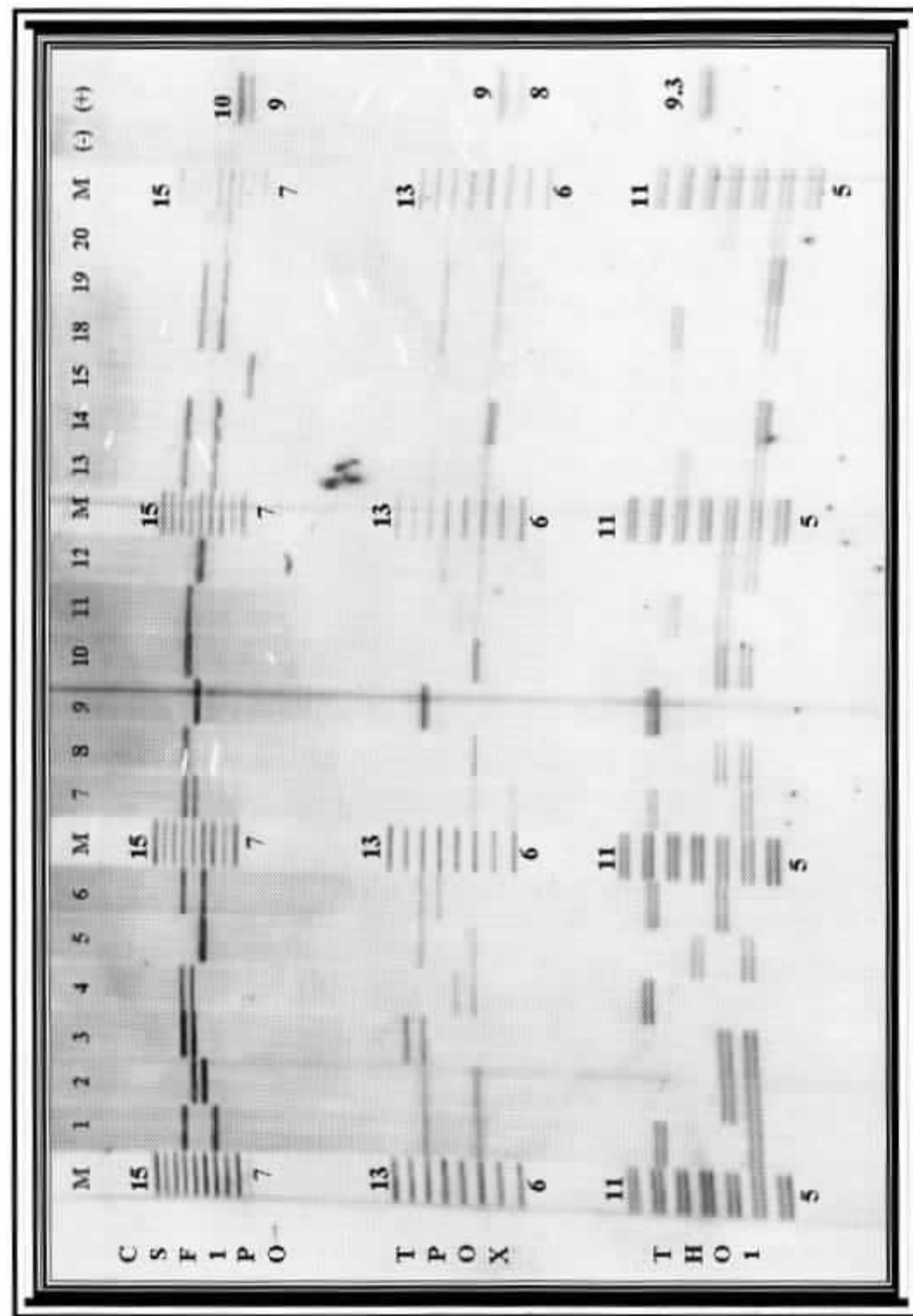


Ilustración 15. Esta foto muestra los patrones alélicos de cada muestra para el marcador CTT, los que diferencian a una persona de otra. En la foto se puede apreciar el control negativo (-) y el control positivo (+) el que amplifica para alelos conocidos de cada locus (CSF1PO alelos 9,10; TPOX alelos 8,9 y vWA alelo 9.3). Las bandas dispuestas en formas de escalera (M) son marcadores escaleras que sirven para determinar el alelo de cada persona. Se presentan los perfiles de 20 muestras (# 1-20).

Gel del marcador FFv

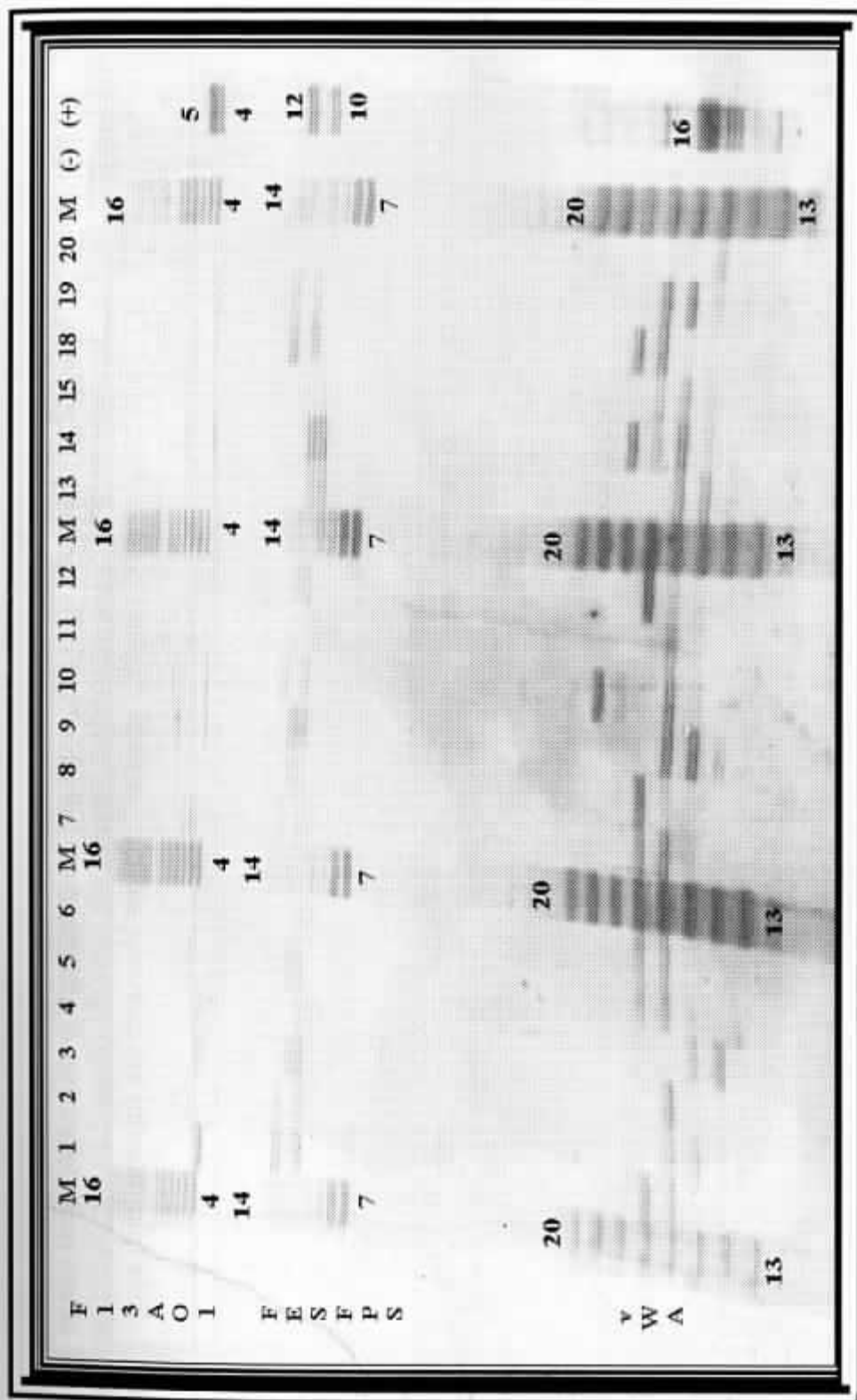


Ilustración 16. Esta foto muestra los patrones alélicos de cada muestra para el marcador FFv, los que diferencian a una persona de otra. En la foto se puede apreciar el control negativo (-) y el control positivo (+) el que amplifica para alelos conocidos de cada locus (F13A01 alelos 4,5; FESFPS alelos 10,12 y vWA alelo 16). Las bandas dispuestas en formas de escalera (M) son marcadores escaleras que sirven para determinar el alelo de cada persona. Se presentan los perfiles de 20 muestras (# 1-20).

Gel del marcador DDD

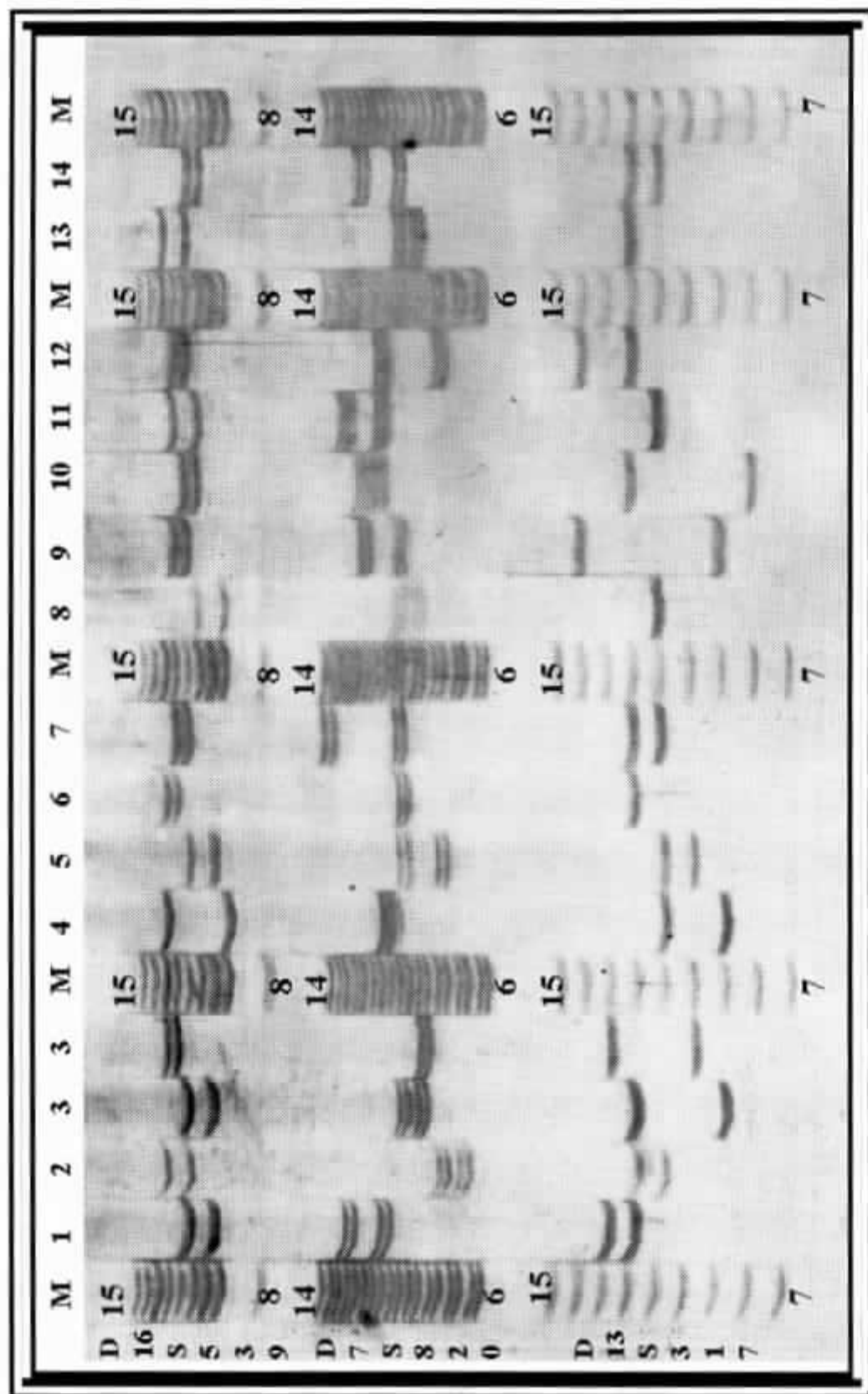


Ilustración 17. Esta foto muestra los patrones alélicos de cada muestra para el marcador DDD, los que diferencian a una persona de otra. En la foto se pueden apreciar las bandas dispuestas en formas de escalera (M), las que son marcadores escaleras que sirven para determinar el alelo de cada persona. Se presentan los perfiles de 14 muestras (# 1-14).

Gel del marcador D1S80

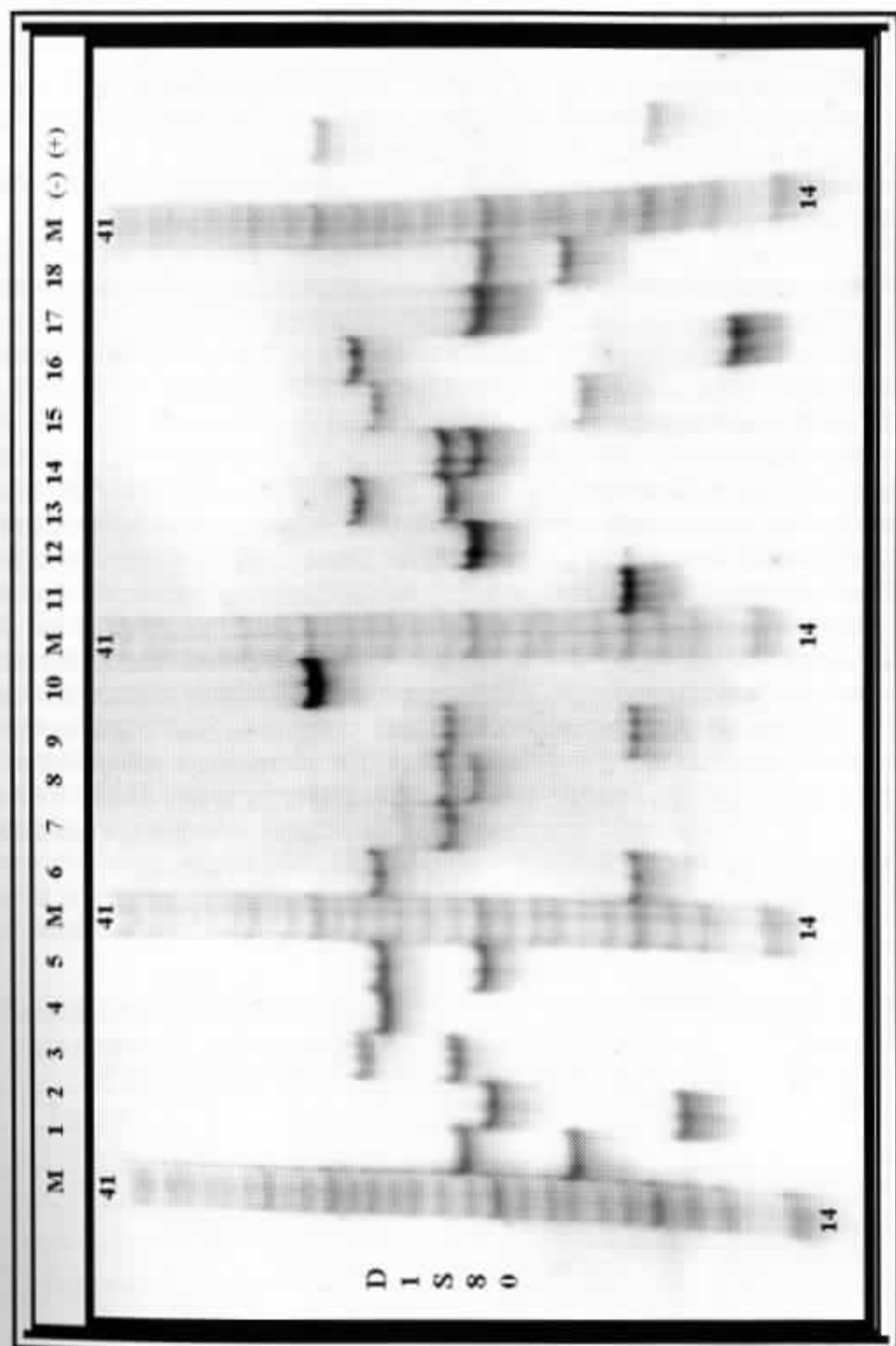


Ilustración 18. Esta foto muestra los patrones alélicos de cada muestra para el marcador D1S80, los que diferencian a una persona de otra. En la foto se puede apreciar el control negativo (-) y el control positivo (+) el que amplifica para alelos 18 y 31. Las bandas dispuestas en formas de escalera (M) son marcadores escaleras que sirven para determinar el alelo de cada persona. Se presentan los perfiles de 18 muestras (# 1-18).

La determinación de las frecuencias alélicas de los locus arriba mencionados demuestra que los alelos de mayor frecuencia representan menos del 45% del total de alelos. Estos resultados se asemejan con los de otros estudios poblacionales de grupos hispanos, en los cuales los alelos de mayor frecuencia coinciden con los aquí presentados, por ejemplo: (Morales y col, 2001; Molares y col, 2000; Peterson y col, 2000; Budowle y col, 1997; Budowle y col, 1995; Rancel-Villalobos y col, 1999; Budowle y col, 2001).

A partir de los resultados obtenidos se elaboró una base de datos de las frecuencias alélicas de los loci antes mencionados para la población nicaragüense, la cual representa la ocurrencia de los alelos de cada locus en nuestra población expresados en términos porcentuales. Esta base de datos es fundamental para la significación estadística de cualquier tipificación genética, porque, al obtener un perfil genético de cualquier individuo, nuestra base de datos nos proporcionará la frecuencia con la cual se presenta ese perfil específico en nuestra población.

Aunque ya se han publicado las frecuencias alélicas de otros marcadores genéticos usan-

do muestras de nicaragüenses residentes en Costa Rica (Morera B y col, 2001), en nuestro estudio reportamos por vez primera la frecuencia de los marcadores AmpliFLP D1S80 y STR CSF1PO, TPOX, THO1, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820, D13S217 para la población nicaragüense.

Heterocigotos y homocigotos

Se determinó el porcentaje de heterocigotos y homocigotos para cada uno de los locus, siendo CSF1PO 72.1% y 27.9%, TPOX 70.3% y 29.7%, THO1 79.3% y 20.7%, F13A01 68.4% y 30.6%, FESFPS 68.5% y 31.5%, vWA 77.5% y 22.5%, D16S539 74.8 y 25.2%, D7S820 73% y 27%, D13S217 81.1% y 18.9%, D1S80 81.8% y 18.2%, respectivamente. Esto demuestra que el porcentaje de heterocigotos está arriba del 68.5% y el porcentaje de homocigotos está debajo del 31.5%. En la cuadro 5 se presentan los porcentajes de heterocigotos y homocigotos por cada locus. El alto porcentaje de heterocigotos es indicativo del alto grado de polimorfismo de los marcadores (Farley y col, 1991). Esta característica tiene gran valor para la realización de estudios poblacionales.

Cuadro 5
Porcentaje de heterocigotos y homocigotos utilizando los marcadores CTT, FFv y D1S80

Locus	Heterocigotos %	Homocigotos %
CSF1PO	72.1	27.9
TPOX	70.3	29.7
THO1	79.3	20.7
F13A01	68.4	30.6
FESFPS	68.5	31.5
vWA	77.5	22.5
D16S539	74.8	25.2
D7S820	73.0	27.0
D13S317	81.1	18.9
D1S80	81.8	18.2

Se presentan los porcentajes de heterocigotos y homocigotos para los marcadores CTT, FFV y D1S80 en la población nicaragüense, donde se observa un alto porcentaje de heterocigotos (> 68.5%) y un bajo porcentaje de homocigotos (< 31.5%).

Equilibrio de Hardy-Weinberg

El análisis de la ley de Hardy-Weinberg se realizó mediante la prueba exacta de Fisher, en que un valor $P > 0.05$ indica que no hay desviación de la ley para los loci en estudio. Así, los loci objeto de nuestro estudio (CSF1PO, TPOX, THO1, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820, D13S217 y D1S80) no demuestran desviación de la ley Hardy-Weinberg en nuestra población ($P > 0.05$) (37). El único locus que mostró desviación fue el locus F13A01, el cual presentó un valor P de 0.002. Esto podría ser debido a las siguientes causas: (1) subestructuras poblacionales dentro de la población nicaragüense con respecto a este locus, como producto de (2) un apareamiento no al azar y (3) eliminación de un alelo de gran tamaño en este marcador lo que conllevaría a la observación de un mayor número de homocigotos. En el cuadro 6 se presenta el valor P de la prueba exacta de Fisher para cada locus.

Cuadro 6
Equilibrio de Hardy-Weinberg en la población nicaragüense

Locus	Valor P
CSF1PO	0.119
TPOX	0.051
THO1	0.146
F13A01	0.002
FESFPS	0.120
vWA	0.325
D16S539	0.071
D7S820	0.361
D13S137	0.704
D1S80	0.290

En esta tabla se muestran los valores P producto del análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba exacta de Fisher. Los locus aquí estudiados no demuestran desviación significativa de la ley de Hardy-Weinberg, a excepción del locus F13A01.

Probabilidad de coincidencia

La probabilidad de coincidencia para los marcadores en estudio fue la siguiente: CSF1PO 0.130, TPOX 0.183, THO1 0.113, F13A01 0.077, FESFPS 0.146, vWA 0.118, D16S539 0.073, D7S820 0.081, D13S317 0.053 y D1S80 0.051. La probabilidad de coincidencia combinada para los siete marcadores se expresa como 1 en 984,783,109.8. En el cuadro 7 se presentan los datos de la probabilidad de coincidencia individual y combinado para cada locus. De esta manera podemos decir que la probabilidad de observar el mismo genotipo en dos personas no relacionadas y escogidas al azar en nuestra población es de 1 en cada 984,783,109.8 personas.

Cuadro 7

Probabilidad de coincidencia usando los marcadores CTT, FFV y DDD

Locus	Probabilidad de coincidencia
CSF1PO	0.130
TPOX	0.183
THO1	0.113
F13A01	0.077
FESFPS	0.146
vWA	0.118
D16S539	0.073
D7S820	0.081
D13S317	0.053
D1S80	0.051

Esta tabla muestra los resultados de la determinación de la probabilidad de coincidencia usando los marcadores CTT, FFv y DDD. Cuyo valor combinado equivale a 1 de cada 984,783,109.8 personas presentarán el mismo genotipo en dos personas no relacionadas y escogidas al azar en la población nicaragüense.

Poder de discriminación

El poder de discriminación para los marcadores en estudio fue el siguiente: CSF1PO 0.858, TPOX 0.759, THO1 0.846, F13A01 0.918, FESFPS 0.834, vWA 0.834, D16S539 0.927, D7S820 0.919, D13S317 0.947 y D1S80 0.949. El poder de discriminación combinado fue de 0.999. En el cuadro 8 se presentan los datos del poder de discriminación individual y combinado para cada locus. En términos probabilísticos, esto sugiere que el 0.1% de la población Nicaragüense podría presentar el mismo perfil de ADN al utilizar la combinación de marcadores moleculares en un caso típico de paternidad o en investigaciones forenses (Huston, 1998).

Esta tabla muestra los resultados de la determinación del poder de discriminación usando los marcadores CTT, FFv y DDD. En términos probabilísticos, esto sugiere que el 0.1% de la población nicaragüense podría presentar el mismo perfil de ADN al utilizar la combinación de marcadores moleculares en un caso típico de paternidad o en investigaciones forenses.

Poder de exclusión

El poder de exclusión para los marcadores en estudio fue el siguiente: CSF1PO 0.398, TPOX 0.460, THO1 0.599, F13A01 0.428, FESFPS 0.553, vWA 0.695, D16S539 0.506, D7S820 0.476, D13S317 0.619 y D1S80 0.633. El poder de exclusión combinado para los siete marcadores fue de 0.996. En el cuadro 9 se presentan los datos del poder de exclusión individual y combinado para cada locus. Estos resultados indican que utilizando los marcadores CTT, FFv, DDD y D1S80, la probabilidad de que dos personas de nuestra población no tengan el mismo genotipo es del 99.6% (National Research Council, 1996).

Cuadro 8
Poder de discriminación usando los marcadores CTT, FFv y DDD

Locus	Probabilidad de discriminación
CSF1PO	0.870
TPOX	0.817
THO1	0.887
F13A01	0.923
FESFPS	0.854
vWA	0.882
D16S539	0.927
D7S820	0.919
D13S317	0.947
D1S80	0.949
PD combinado	0.999

Cuadro 9
Poder de exclusión de los marcadores CTT, FFv y DDD

Locus	Probabilidad de Exclusión
CSF1PO	0.461
TPOX	0.432
THO1	0.586
F13A01	0.419
FESFPS	0.405
vWA	0.553
D16S539	0.506
D7S820	0.476
D13S317	0.619
D1S80	0.633
PE combinado	0.996

Esta tabla muestra los resultados de la determinación del poder de exclusión de los marcadores CTT, FFv y D1S80. Estos resultados indican que utilizando los marcadores antes mencionados la probabilidad de que dos personas en nuestra población no tengan el mismo genotipo es del 99.6%.

Índice típico de paternidad

El índice típico de paternidad para los marcadores estudiados fue el siguiente: CSF1PO 1.56, TPOX 1.79, THO1 2.50, F13A01 1.67, FESFPS 2.22, vWA 3.33, D16S539 1.98, D7S820 1.85, D13S317 2.64 y D1S80 2.75. El índice de paternidad combinado fue de 403.23.

En el cuadro 10 se presentan los valores del índice típico de paternidad individual y combinado para cada locus. Este resultado aplicado a estudios de paternidad da una probabilidad de inclusión de paternidad del 99.8%, lo cual equivale a una paternidad probada estadísticamente.

Esta tabla muestra los resultados de la determinación del índice típico de paternidad para los marcadores CTT, FFv y DDD. Estos resultados demuestran que el uso de los marcadores antes mencionados aplicados a un caso de paternidad dará una probabilidad de inclusión de paternidad del 99.8%, lo que equivale a una paternidad probada estadísticamente.

Los resultados presentados en este estudio indican que los sistemas marcadores CTT, FFv, DDD y D1S80 pueden ser de mucha utilidad en estudios de interés forense y de investigaciones criminales en la población nicaragüense. Esta es la primera vez que se establece esta tecnología en el país.

La base de datos de frecuencias alélicas específicas para la población nicaragüense, obtenidas a partir de este trabajo de investigación, representa un recurso indispensable para la tipificación de ADN humano.

Un sumario de todos los resultados se presentan en la cuadro 11

Cuadro 10
Índice típico de paternidad (ITP) para
los marcadores CTT, FFv y DDD

Locus	Índice típico de paternidad
CSF1PO	1.79
TPOX	1.68
THO1	2.41
F13A01	1.63
FESFPS	1.59
vWA	2.22
D16S539	1.98
D7S820	1.85
D13S317	2.64
D1S80	2.75
ITP combinado	403.23

Cuadro 11

Frecuencias alélicas de los marcadores CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESEPS, vWA, D16S539, D7S820 y D13S317 en la población nicaragüense.

Allele	CSF1PO	TPOX	TH01	F13A01	FESEPS	vWA	D16S539	D7S820	D13S317	D18S0
3,2				0,288						
4				0,090						
5				0,198						
6		0,005	0,351	0,140						
7	0,009	0,005	0,293	0,221				0,014		
8	0,005	0,459	0,065	0,059	0,018		0,036	0,072	0,063	
9	0,023	0,122	0,095	0,005			0,131	0,068	0,198	
9,3			0,113							
10	0,270	0,050	0,072		0,140		0,243	0,275	0,113	
11	0,291	0,302	0,009		0,450		0,252	0,311	0,239	
12	0,333	0,059			0,257	0,005	0,185	0,194	0,207	
13	0,059				0,095	0,009	0,093	0,059	0,090	
14	0,009				0,041	0,041	0,018	0,009	0,081	
15						0,167				0,015
16						0,405				
17						0,230				0,015
18						0,108				0,121
19						0,027				
20						0,009				
21						0,005				0,030
22										
23										
24										0,242
25										0,182
26										0,015
27										
28										0,091
29										0,060
30										0,045
31										0,076
32										
33										
34										
35										
36										0,015
37										0,015
38										
39										
40										0,015
Hex	0,729	0,677	0,362	0,798	0,703	0,746	0,806	0,781	0,831	0,882
Hob	0,72	0,711	0,792	0,684	0,684	0,783	0,747	0,729	0,810	0,818
PD	0,87	0,817	0,887	0,923	0,854	0,882	0,927	0,919	0,947	0,949
PE	0,461	0,432	0,586	0,419	0,405	0,553	0,506	0,476	0,619	0,633
p	0,119	0,051	0,146	0,002	0,12	0,325	0,071	0,361	0,704	0,290
PI	1,59	1,68	2,41	1,63	1,59	2,22	1,98	1,85	2,64	2,75

Aquí se presenta una sistematización de los resultados encontrados en este estudio con respecto a la población nicaragüense. Hex, Heterocigocidad esperada; Hob, Heterocigocidad observada; PD, poder de discriminación; PE, poder de exclusión; p, equilibrio de Hardy - Weinberg (basado en la prueba exacta de Fisher); PI, índice de paternidad.

V. Discusión

Bases de datos

Las bases de datos poblacionales que reflejan la frecuencia de alelos de genes usados rutinariamente poseen una aplicación primordial en trabajos de identificación humana e investigación forense. En este estudio, primeramente se establecieron las frecuencias alélicas específicas de la población nicaragüense respecto a diez marcadores genéticos distintos, partiendo del análisis del ADN obtenido de voluntarios anónimos sanos de la Cruz Roja. Se determinó, además, el porcentaje de heterocigotos y homocigotos, el índice de paternidad y el poder de exclusión de los marcadores mencionados. Con estos datos se construyó la primera base de datos de ADN humano, constituyendo el perfil genético de la población nicaragüense.

La base de datos aquí conformada consiste de las frecuencias alélicas establecidas para los alelos AmpliFLP y *GenePrint* D1S80, CSF1PO, TPOX, THO1 (CTT), F13A01, FESFPS, vWA (FFv) y D16S539, D7S820, D13S317 (DDD).

Este estudio se planteó objetivos académicos de carácter descriptivo, para lo cual se definieron los perfiles genéticos de ciudadanos nicaragüenses de diversas localidades del país. En lo que respecta al material biológico de muestras de voluntarios, al finalizar el estudio se procedió a su debida eliminación. Es importante mencionar que en el extranjero existen muchos tipos de laboratorios y centros de investigación forense, los cuales conservan bases de datos de ADN sobre diversos sujetos de investigación con una finalidad más bien judicial.

Aquí definimos como bases de datos de ADN al archivo sistemático de perfiles genéticos

determinados a partir del ADN de ciudadanos nicaragüenses. Sin embargo, en otros estudios bajo la misma terminología se incluye además el archivo de material genético de determinados grupos para diversos fines. Así encontraremos bases de datos generales, de profesionales de riesgo, judiciales (personas desaparecidas) y criminales (convictos, sospechosos, víctimas, y otros). Algunos autores diferencian tres tipos de bases de datos. En el primero se realiza un análisis general de la población total; el segundo tipo consiste de una serie de bases de datos agrupadas según los tipos de delitos cometidos; y por último, un tipo de bases de datos restringidas a casos específicos. Todo parece indicar que el sistema de análisis según los tipos de delitos es el que más aceptación tiene (Parson y col, 1998; Guillén y col, 2000).

Tanto EEUU como Inglaterra mantienen bases de datos de ADN de uso rutinario que archivan perfiles de criminales y condenados por agresiones sexuales. En otros países industrializados como España se han establecido instalaciones y laboratorios nacionales y bases de datos forenses en donde se almacenan huellas genéticas de criminales o delincuentes declarados culpables. Estas bases de datos sirven en la identificación de criminales reincidentes. En los mismos laboratorios se puede almacenar, además, información genética sobre personal del ejército o de la policía, bomberos y otros individuos de interés para facilitar la identificación de cadáveres en caso de accidentes y tragedias.

La Base de Datos Nacional de Inglaterra y Wales dispone de más de 60 mil muestras de perfiles de ADN provenientes de personas involucradas en crímenes y sospechosos. Además, la policía complementa estos datos con otras informaciones relevantes como las huellas dactilares de estos individuos con la finalidad de disponer de mucha información

para investigaciones futuras. Estas bases de datos, en conjunto con otras estadísticas criminales, han establecido previamente una correlación entre aquellos que han cometido crímenes horrendos recientes y los que tienen un historial de crímenes. Otros países europeos que cuentan ya con bases de datos de ADN, para esclarecimiento de delitos son: Holanda, Alemania, Bélgica, Finlandia, Francia, Noruega, Suecia, Suiza y Dinamarca (Schneider, 1998).

Las limitaciones económicas de los países en vías de desarrollo impiden que estos países puedan hacer uso de las tecnologías modernas, lo cual, a su vez, repercute grandemente en sus posibilidades de desarrollo económico y bienestar social. Así, son pocos los países en vías de desarrollo que están utilizando la tecnología de ADN y sus aplicaciones en la agricultura, industria y medicina. De estos países, sólo unos cuantos han construido sus bases de datos poblacionales, lo que les obliga a tener que respaldar sus datos utilizando como referente las bases de datos disponibles, las cuales no necesariamente son adecuadas o compatibles con la realidad de otras poblaciones. De allí la necesidad de crear una base de datos propia de cada población.

En Nicaragua, los estudios forenses de casos criminales, específicamente de violaciones sexuales, se efectúan por medio de técnicas colorimétricas y por detección de espermatozoides por microscopía. Estos procedimientos apuntan al sospechoso de violación, pero no son capaces de determinar concluyentemente al autor del delito.

En los últimos años, el incremento de la actividad delictiva ha sido un tema de gran preocupación para la sociedad civil, en general, y para las fuerzas policiales del país. Dentro del amplio espectro de delitos que se cometen,

los casos de violación han venido en aumento año tras año. Los adolescentes, niñas y niños son las principales víctimas. Según el anuario del 2002 de la Policía Nacional, el número de mujeres violadas sexualmente ascendió a cerca de un mil doscientas.

Partiendo de esta primera experiencia de construcción de bases de datos de ADN en Nicaragua, podría procederse a la creación de una base de datos para objetivos específicos de las investigaciones que realiza la Policía Nacional de modo similar al establecido en otros países más avanzados. Proyectos de este tipo serían bien recibidos y apoyados por instituciones promotoras de los derechos de la mujer y la infancia.

Características genéticas: identificación vs. enfermedades

Las características genéticas utilizadas en el presente estudio, para la identificación de individuos, no brindan información alguna sobre los rasgos físicos o étnicos de la persona. Esto se debe a que las regiones del ADN en estudio o marcadores específicos son regiones no codificantes. Sin embargo, de utilizarse otros marcadores genéticos, bien se podría obtener otro tipo de información como, por ejemplo, el sexo del individuo y la localización de mutaciones asociadas a enfermedades. De modo que la existencia de marcadores genéticos y de otras herramientas modernas de la genética y la biotecnología, además de facilitar, por un lado, la identificación de violadores o delincuentes, permiten también profundizar sobre la base genética de múltiples enfermedades.

Por otro lado, una mejor comprensión de la función y control de los genes mejorará el conocimiento de un organismo sano, pero

también de los fundamentos moleculares de enfermedades tan distintas como el cáncer, el SIDA, las afecciones cardiovasculares y el alzheimer, por mencionar algunas. Algunos estudios que utilizan tecnología de ADN permiten también diagnosticar la presencia de algún gen marcador indicativo de la presencia o predisposición genética a alguna enfermedad. Las alteraciones genéticas son responsables de aproximadamente entre 3,000 y 4,000 enfermedades hereditarias, tales como la enfermedad de Huntington y la distrofia muscular de Duchenne.

El progreso del diagnóstico clínico y el conocimiento sobre las características genéticas de un individuo proporcionan información sobre la predisposición de una persona a padecer ciertas enfermedades si ésta se ve expuesta a ciertas condiciones ambientales determinantes. Aún más, considerando los logros y posibilidades provenientes de la determinación del Genoma Humano (2003) será posible algún día obtener más información sobre los genotipos individuales, lo cual habrá de conllevar a una atención médica más individualizada.

Implicaciones éticas y legales

La identificación humana por ADN tiene una doble orientación: por un lado, la investigación biológica de la paternidad, y por otro, la investigación criminal. Aunque las bases técnicas y analíticas de ambos procesos son las mismas, las circunstancias y planteamientos son diferentes, y por tanto, también diferentes en el ámbito ético-jurídico. La resolución de casos de paternidad tiene una importante repercusión social por cuanto logra establecer lazos de parentesco dentro de una familia. En muchos casos, la determinación de la paternidad puede conllevar al reconocimiento, por la ley, de los derechos de los menores y al

debido cumplimiento de obligaciones morales y económicas por parte de los padres.

En el fuero penal, la identificación por ADN permite, mediante el cotejo de restos biológicos encontrados en la escena del crimen con la sangre de los sospechosos, identificar al autor o eximir de culpa al inocente. Respecto a esta última utilidad se comenta muy poco. Sin embargo, estadísticas recientes de análisis realizados en EE.UU. señalan que al menos un 30% de los análisis de ADN demuestran la inocencia de los imputados. De modo que, mediante la aplicación de estas tecnologías, no solamente se logra identificar a los autores de delitos, sino que también se puede demostrar la inocencia de muchas personas.

En el contexto de la identificación humana por ADN, tanto la resolución de casos de paternidad, como también los casos de interés médico-forense, pueden plantear varios dilemas sociales, éticos y jurídicos. Algunas de estas preocupaciones incluyen, por ejemplo, la obligatoriedad o no, por parte del sospechoso de proveer muestras para análisis, la validez de las muestras recaudadas por la policía, y el uso apropiado de bancos de datos de ADN para facilitar la investigación criminal. En estas situaciones procede hacer un balance entre los derechos individuales del acusado y el interés público de establecer justicia.

Actualmente, las aplicaciones del análisis de ADN en el ámbito de la justicia se utilizan con vasta eficacia, ya que mediante su aplicación el jurista moderno cuenta con una herramienta de valor inestimable en la resolución de casos. En Nicaragua, si bien la ley permite a los jueces decidir según su propio criterio respecto a la inclusión de pruebas de ADN, no existe una regulación específica al respecto. De modo que, a pesar de la importancia de

esta prueba en los casos de paternidad discutida, en la mayoría de los casos aún no se está considerando como medio de prueba tanto en el fuero civil como en el fuero penal. Sin embargo, todo indica que, más recientemente y con el auxilio de laboratorios extranjeros, la Policía Nacional ya está empezando a utilizar este tipo de evidencia, lo cual aporta elementos objetivos sobre los cuales se puede centrar la investigación de los hechos.

Respecto a las críticas sobre la existencia de bases de datos de ADN, éstas no se centran sobre la conveniencia o no de las mismas como instrumentos para combatir la criminalidad, ni tampoco contra la admisibilidad de las pruebas, sino más bien sobre la posibilidad de que a partir de las bases de datos se infieran datos o informaciones que afecten la privacidad e intimidad de las personas.

Las bases de datos que consisten de perfiles genéticos de poblaciones, como es el caso de este estudio, debido a su especificidad técnica no pueden destinarse a otro tipo de análisis más que para el que fueron construidas. Sin embargo, hasta ahora, en el país no existen pautas normalizadas elaboradas específicamente para la protección de la información en cualquier tipo de bases de datos poblacionales. Además es legítima la preocupación que algunas bases de datos caigan en manos de personas e instituciones inescrupulosas. En cualquier caso queda claro que cada país tiene que proveer garantías y regular el uso adecuado de la información genética disponible.

Puesto que muchos de los temas que se plantean alrededor de las pruebas genéticas y de las bases de datos tienen que ver con aspectos éticos, filosóficos y jurídicos, es justo que un debate serio sobre estas implicaciones debería consistir de un esfuerzo multidisciplinar de especialistas en biología molecular y

genética humana, así como también de sociólogos y juristas, por nombrar unos cuantos. Un reto importante en relación a estos temas es la capacitación de los expertos y profesionales necesarios para brindar a la población una mejor cobertura de servicios genéticos, así como también atender las repercusiones sociales y jurídicas provenientes de estos avances científicos.

VI. Conclusiones

El desarrollo científico y técnico de la biología molecular y la genética han conllevado a la implementación de la tecnología de ADN en la resolución de problemas y dificultades en esferas tan diversas como la medicina y la agricultura. En particular, el estudio del ADN ha impulsado enormemente la identificación biológica forense, tanto en la investigación criminal como en la investigación de la paternidad. Actualmente, el estudio del ADN y la existencia de bases de datos poblacionales nos proporcionan un conjunto de propiedades que estadísticamente permiten la identificación de personas con una probabilidad práctica del 100%.

La identificación de personas tiene ventajas y consecuencias individuales y sociales, las cuales deben ser consideradas seriamente en su contexto ético-jurídico. Del mismo modo que con otros temas actuales de la biotecnología y la biología molecular, uno de los retos principales posiblemente sea poder divulgar, en lenguaje sencillo e inteligible, la información técnica fundamental y los criterios éticos y sociales imprescindibles para la toma de decisiones basada en la información y el análisis crítico y equilibrado de la situación expuesta.

VII. Agradecimientos

Este trabajo de investigación contó con el apoyo financiero de la Fundación New England Biolabs. El MSc. Luis Williams participó en la etapa inicial de este proyecto y algunos de sus experimentos se tomaron en cuenta en el análisis de resultados. Agradecemos la colaboración del Capitán Luis Aguirre de la Policía Nacional, así como la contribución del Dr. René Berrios y el Ing. Edgar Jiménez de la Cruz Roja Nicaragüense. Gracias al Dr. Bruce Budowle del Buró Federal de Investigaciones (FBI, EEUU) por su auxilio en el análisis de los resultados.

VIII. Bibliografía consultada

- AmpliFLP™ D1S80 PCR amplification kit - Perkin Elmer Technical Manual.
- ANDERSEN, J. F.; GREENHALGH, M. J.; BUTLER, H. R.; KILPATRICK, S. R.; PIERCY, R. C.; WAY, K. A.; MYHILL, H. S.; WRIGHT, J. C.; HALLETT, R and PARKIN, B.H. (1996). "Further validation of a multiplex STR system for use in routine forensic identity testing". *Forensic Science International*. 78: 47-64.
- BAECHTEL, F.S.; PRESLEY, K.W and SMERICK, J.B (1995). *D1S80 typing of DNA simulated forensic specimens*. Journal of forensic sciences. Vol. 40, No. 4, pp 536-545.
- BILLE, T.W. (1999). "DNA analysis: A powerful investigative tool. Profiles in DNA". Vol 3, No. 2, pp 8-9.
- BUDOWLE, B.; BAECHTEL, F.S.; SMERICK, J.B.; PRESLEY, K.W.; GIUSTI, A.M.; PARSONS, G.; ALEVY, M.C and CHAKRABORTY R. (1995). "D1S80 population data in African Americans, Caucasians, Southeastern Hispanics, Southwestern Hispanics, and Orientals. Journal of Forensic Sciences". Vol. 40. No. 1, pp 38-44.
- BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J and ALLEN, R.C. (1991). "Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE". *Am. J. Hum. Genet.* 48:137-144.
- BUDOWLE, B.; SHEA, B.; NIEZGODA, S. and CHAKRABORTY, Y. R. (2001). "CODIS STR loci data from 41 sample populations". *Journal of Forensic Sciences*, 46 (3): 453-489.
- BUDOWLE, B.; SMERICK, J.B.; KEYS, K.M. and MORETTI, T.R. (1997). "United states population data on the multiplex short tandem repeat loci - HUMTHO1, TPOX and CSF1PO- and the variable number tandem repeat locus D1S80". *Journal of Forensic Sciences*, 42 (5): 846-849.
- CHAKRABORTY, R.; STIVERS, D.N.; SU, B.; ZHONG, Y. and BUDOWLE, B. (1999). "The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: Implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis*, 20, pp 1682-1696.
- COLEMAN, H. and SWESON, E. (1994). *DNA in the courtroom - A trial watchers guide*. GeneLex Press, Seattle, Washington, pp 19-74.

- COSSO, S. and REYNOLDS, R. (1995). "Validation of the AmpliFLP D1S80 PCR amplification kit for forensic casework analysis according to TWGDAM guidelines". *Journal of forensic sciences*. Vol. 40. No. 3. pp 424-434.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A. and CASKEY, T. (1991). "DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats". *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746-756.
- EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN, L.; CASKEY, T. and CHAKRABORTY, R. (1992). "Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups". *Genomics* 12, 241-253.
- FARLEY, M.A. and HARRINGTON, J.J. (1991). *DNA technology*. Lewis publishers. Inc. Chelsea. Michigan. pp 51-63.
- GenePrint STR System (Silver Stain Detection) - Promega Technical Manual.
- GILLESPIE, J.H. (1998). *Population Genetics: A concise guide*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. pp 10-48.
- GUILLÉN, M., LAREU, M.V.; PESTONI, C.; SALAS, A. and CARRACEDO, A. (2000). "Ethical - legal problems of DNA databases in criminal investigation". *Journal of Medical Ethics*; 26:266-271.
- GUO, S.W. and THOMPSON, E.A. (1992). "Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles". *Biometrics* 48: 361-372.
- HAMMOND, H.A.; JIN, L.; ZHONG, Y. CASKEY, C.T. and CHAKRABORTY, R. (1994). "Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications". *Am. J. Hum. Genet.* 55: 175-189.
- HERNANDEZ, J.L. and WEIR, B.S. (1989). "A disequilibrium coefficient approach to Hardy-Weinberg testing". *Biometrics* 45:53-70.
- HOCHMEISTER, M.N.; BUDOWLE, B.; BORER, V. and DIRNHOFER, R. (1995) "A method for the purification and recovery of genomic DNA from an HLA DQA1 amplification product and its subsequent amplification and typing with the Amplitype PM PCR amplification and typing kit". *Journal of Forensic Sciences.*, Vol. 40, No. 4, pp 649-653.
- HOECHMEISTER, M. (1997). "Use of the GenePrint CSF1PO, TPOX, THO1 multiplex system (CTT) for the analysis of DNA evidence in a serial killer case. Profiles in DNA". Vol. 1, No. 2: 3-6.

- HOECHMEISTER, M.N.; BUDOWLE, B.; BORER, U.V.; EGGMANN, U.; CONNEY, C.T. and DIRNHOFER, R. (1991). "Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone human remains". *Journal of forensic sciences*. Vol. 36. No. 6: 1649-1661.
- HOFF-OLSEN, P.; JACOBSEN, S.; MEVÅ, G. B. and OLAISEN, B. (2001). "Microsatellite stability in human post-mortem tissues". *Forensic Science International*. 119: 273-278.
- HONDA, K.; NAKATOME, M.; ISLAM, M.N.; BAI, H.; OGURA, Y.; KUROKI, H.; YAMAZAKI, M.; TEREDA, M.; MISAWA, S. and WAKASUGI, C.H. (1995). Detection of D1S80 (pMCT118) locus polymorphism using semi-nested polymerase chain reaction in skeletal remains". *Journal of forensic sciences*. Vol. 40, No. 4: 637-640.
- HUSTON, K.A. (1998). Statistical analysis of STR data. *Profiles in DNA*. Vol. 1, No. 3: 14-15.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. and THEIN, S.L. (1985). "Individual-specific fingerprinting of human DNA". *Nature*, vol. 316, pp 76-79.
Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. (1988). "Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells". Nucleic Acids Research. Vol 16, No 23, pp 10953-10971.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V. and THEIN, S.L. (1985). *Hypervariable minisatellite regions in human DNA*". *Nature*, vol. 314, pp 67-73.
- KASAI, K.; NAKAMURA, Y. and WHITE, R. (1990). "Amplification of a variable number of tandem repeat (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science." *Journal of Forensic Sciences*. Vol. 35, pp 1196-1200.
- LEWIS, P.O. and ZAYKIN, D. (2001). *Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data*. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- LINS, A.M.; MICKA, K.A.; SPRECHER, C.J.; TAYLOR, J.A.; BACHER, J.W.; RABBACH, D.R.; BEVER, R.A.; CREACY, S.D. and SCHUMM, J.W. (1998). "Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system". *Journal of forensic Science*.; 42 (6): 1168-1180.
- LINS, A.M.; SPRECHER, C.J.; PUERS, C.H. and SCHUMM, J. (1996). "Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci silver stain and fluorescence detection". *Biotechniques* 20: 882-889.

- MORALES, A.I. ; MORERA, B.; JIMENEZ-ARCE, G.; SANCHEZ-RIVERA, G.; CALAFELL, F and BARRANTES, R. (2001). "Allele frequencies of markers LDLR, GYPA, D7S8, HBG, GC, HLA-DQA1 and D1S80 in the general and minority populations of Costa Rica". *Forensic Science International*. 124: 1-4.
- MORALES, J.; MONTERROSA, J.C.; ALVAREZ, J.C.; ENTRALA, C.; LORENTE, J.A.; LORENTE, M.; VILLANUEVA, E and BUDOWLE, B. (2000). "El Salvador (Central America) population data for the D1S80 and D17S5 (YNZ22) loci". *Progress in Forensic Genetic* 8: 359-361.
- MORERA, B.; SANCHEZ-RIVERA, G.; JIMENEZ-ARCE, G.; CALAFELL, F and MORALES-CORDERO, A.I.(2001). "Nicaraguan population data on LDL, GYPA, D7S8, HBG, GC and HLA-DQA1 loci". *Rev Biol Trop*. 49 (3-4): 1253-60.
- MULLIS, K. B and FALOONA, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction". *Methods in enzymology*. Vol. 155: 335-350.
- NAKAMURA, Y.; CARLSON, M.; KRAPCHO, K and WHITE, R. (1988). "Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT118) on chromosome 1p [D1S80]. *Nucleic acid research*. Vol. 16, No. 19. pp 9364.
- National Research Council. (1996). "The evaluation of Forensic DNA evidence. National Academy Press, Washington DC, pp 9-124.
- PARSON, W.; STEINLECHNER, M.; BERGER, B.; KÖCHL, S and SCHEITHAUER, R. (1998). Laboratory strategy of the Austrian DNA intelligence database. *Proceedings of the 2nd European Symposium on Human Identification*. Madison, WI, USA: Promega Corporation.
- PETERSON, B.L.; SU, B.; CHAKRABORTY, R.; BUDOWLE, B and GAENSSLEN, R.E. (2000). World population data for the HLA-DQA1, PMO and D1S80 loci with least and most common profile frequencies for combinations of loci estimated following NRC II guidelines. *Journal of Forensic Sciences*. 45 (1): 118-146.
- RANGEL-VILLALOBOS, H.; RIVAS, F.; TORRES-RODRÍGUEZ, M.; JALOMA-CRUZ, A. R.; GALLEGOS-ARREOLA, M.P.; LOPEZ-SATOW, J.; CANTÚ, J. M. and FIGUERA, L.E. (1999). "Allele frequency distributions of six Amp-FLPS (D1S80, APO-B, VWA, THO1, CSF1PO and HRPTB)" in a Mexican population. *Forensic Science International*. 105: 125-129.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. ARNHEIM, N. (1985). "Enzymatic amplification of b-Globin genomic sequences

and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science*. Vol. 230: 1350-1354.

- SCHNEIDER, P.M.. (1998). *PM, DNA Databases for offender identification in Europe - the need for technical, legal and political harmonization*. Proceedings of the 2nd European Symposium on Human Identification. Madison, WI, USA: Promega Corporation.
- SKINKER, D.M.; WARNECKE, S.C.; MORROW, J.K. and HUNSAKER, J.C. (1997). "DNA typing of azoospermic semen at the D1S80 locus". *Journal of Forensic Sciences*. 42 (4): 718-720.
- SPRECHER, C.J.; PUERS, C.H.; LINS, A.M. and SCHUMM, J.W. (1996). "General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci". *Biotechniques* 20: 266-276.
- TEREBA, A. (1999). "Tools for analysis of population statistics". *Profiles in DNA*. Vol. 2, No. 3: 14-16.
- TRACEY, M. (2000). "Short tandem repeat-based identification of individuals and parents". *Croatian Medical Journal*. 42 (3): 233-238.
- WALSH, P.S.; FILDES, N.J. and REYNOLDS, R. (1996). "Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus *vWA*". *Nucleic acid research*, Vol. 24, No. 14, pp 2807-2812.
- WALSH, P.S. ; METZER, D.A. and HIGUCHI, R. (1991). "Chelex 100 as a medium for single extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material". *Biotechniques*, vol. 10, No. 4, pp 506-513.
- WILLIAMS, J.S. (1976). "An exact test of the Hardy-Weinberg law". *Biometrics* 32: 183-189.
- ZAYKIN, D.; ZHIVOTOVSKY, L. and WEIR, B.S. (1985). "Exact test of association between alleles at arbitrary numbers of loci". *Genetica* 96: 169-178.

IX. Anexo

Recomendaciones para la recolección y conservación de material biológico en medicina forense.

Las siguientes recomendaciones son útiles para procesos de investigación forense ejecutados por personal de laboratorio de criminalística con fines de interés social o legal.

Notas generales

-Solicite información general sobre los acontecimientos con el personal a cargo del área antes de ingresar e iniciar el proceso de recolección.

-Tome el control y camine cautelosamente alrededor de la escena del crimen. Mantenga fuera de ésta a toda persona no autorizada.

-Recuerde que sólo hay una oportunidad para recolectar apropiadamente las muestras.

-Condúzcase cautelosamente en el área de recolección, evitando la pérdida y contaminación de la evidencia.

-Trate de asegurarse que el personal que efectúe la recolección tenga la suficiente aptitud, entrenamiento y experiencia para garantizar un buen manejo de las muestras.

-Es necesario mantener una comunicación fluida y franca con los investigadores, cuerpos policiales, procuradores y cuerpo médico presentes.

-Siempre manténgase en alerta, tome notas y considere sobre todo la seguridad del personal.

-No manipule excesivamente la muestra después de recolectada.

-Marque la localización de las evidencias.

-Constantemente realice una autoevaluación de los procedimientos en el manejo y búsqueda de muestras biológicas.

-Recuerde que la escena del crimen será liberada hasta que todas las partes involucradas den por concluido el trabajo.

-El control emocional le permitirá garantizar una mejor calidad de las muestras.

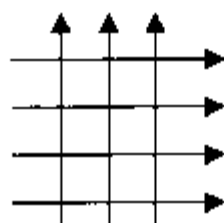
-Tome apuntes de los factores bióticos y abióticos del medio ambiente del perímetro de búsqueda.

-Inicialmente enfóquese en las evidencias que podrían perderse y deje de último aquellos que se pueden preservar físicamente. Recuerde que no todas las evidencias son visibles.

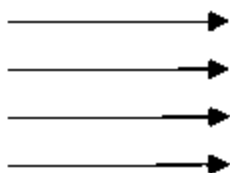
-Evalúe si las evidencias pudieron haber sido movidas inadvertidamente.

-Inicie su patrón de búsqueda de lo general a lo más específico.

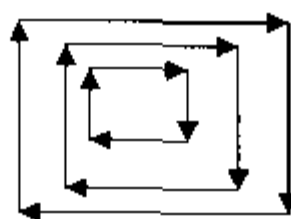
-Dos personas deben de ser designadas en el proceso de recolección de las evidencias, siguiendo los siguientes modelos de búsqueda:



Cuadrícula



Lineal



Espiral

Recolección y manejo del material biológico

1. Desarrolle el proceso de recolección del material biológico, bajo condiciones de estricta esterilidad. Para poder observar estas condiciones es necesario usar guantes descartables de látex, instrumentos esterilizados (pinzas, tijeras, etc). Si es necesario reutilizar los instrumentos se recomienda esterizarlos nuevamente o utilizar nuevos. Cámbiese de guantes en caso que se toque la muestra en el proceso de recolección. Además observe todas las medidas de bioseguridad necesarias para proteger al personal de posibles agentes infecciosos.

2. Cuando se recojan muestras semejantes, ubicadas en lugares próximos, es recomendable utilizar diferentes recipientes debidamente etiquetados.

3. El etiquetado de la muestra debe hacer referencia a:

- a. Fecha y hora de recolección.
- b. Identificación o descripción de la víctima.
- c. Localización, tipo y número de la muestra.
- d. Nombre de la persona que efectúa la recolección.
- e. Referencia al caso judicial.

En este proceso se recomienda que la misma persona que efectúa el muestreo sea la que realice el etiquetado.

4. Remita a los juzgados o laboratorios el material bajo condiciones óptimas de conservación (~ 4°C), debidamente sellado y conteniendo un listado cronológico del material recolectado. Se recomienda procesar las muestras lo más pronto posible ya que períodos prolongados de conservación pueden dañar el material biológico.

5. Es sumamente imprescindible tomar muestras testigo o controles de la víctima y sospechoso, tomando muestra de sangre o frontis de la cavidad bucal. Para ello es necesario contar con la autorización de familiares o de las personas implicadas. También tome muestras control de los materiales físicos utilizados y recolectados.

6. Levante un listado de las personas que intervinieron en el proceso de recolección, o participaron en el proceso investigativo o estuvieron presentes en el área de escrutinio. Esto se hace con la finalidad de descartar algún problema de contaminación que pudiese presentarse en los análisis, sobre todo cuando se trabaja con material biológico sumamente susceptible a la contaminación cruzada.

Recuerde que si las evidencias no fueron adecuadamente documentadas, recolectadas,

empacadas y preservadas, éstas no podrán soportar su carácter legal y científico ante los administradores de la justicia.

- Si la evidencia de ADN no es documentada adecuadamente, su origen puede ser cuestionado.

- Si no se recolectó el material adecuadamente la actividad biológica se puede perder.

- Si no se empaca adecuadamente, puede ocurrir contaminación.

- Si la muestra no es adecuadamente preservada puede ocurrir la descomposición y deterioramiento del ADN.

Cuidados especiales con algunos tipos de muestras

Muestras líquidas (sangre, semen, saliva, orina, etc).

Se deben recoger con medios estériles (jeringas descartables, pipetas, goteros, gasas, algodón o hisopos). La sangre en estado líquido debe mantenerse en medio anticoagulante (0.5 ml EDTA). El muestreo de rastros biológicos húmedos se efectúa dejándolos secar a temperatura ambiente antes de almacenarlos. Posteriormente, éstos son guardados en frascos o envueltos en papel. No se recomienda usar bolsas plásticas. Bajo

ninguna circunstancia almacenar material en estado húmedo ya que esta condición favorece el crecimiento de microorganismos que pueden afectar la calidad del material.

Manchas secas (objetos manchados con sangre, semen, saliva y otros.

Éstas se pueden localizar en una gran variedad de objetos. Muchas están sobre objetos transportables (cuchillos, armas, cortinas, ropa, alfombras, etc) y otras se ubican sobre superficies no requisables (muebles, piso, sanitarios, etc). En este caso, la mancha es recogida humedeciendo un hisopo con agua destilada, y secado a temperatura ambiente. Alternativamente se puede raspar el área de ubicación de la mancha con un instrumento esterilizado.

Restos sólidos (tejidos, cabellos, dientes, huesos, etc).

Se recomienda observar las medidas de precaución necesarias en la recolección y almacenamiento, para evitar cualquier daño o contaminación colateral. Cuando se recojan cabellos hay que almacenarlos en recipientes separados aunque estos aparezcan visualmente idénticos. En el caso de los huesos, éstos deben ser manipulados con guantes para evitar cualquier contaminación epitelial o de sudor. En caso en que éstos estuviesen enterrados limpiarlos con polvo de óxido de aluminio utilizando una brocha nueva y bajo ninguna circunstancia lavarlos.

Glosario

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Macromolécula que normalmente está formada por cadenas polinucleotídicas antiparalelas, unidas por puentes de hidrógeno, en que el residuo azúcar es la desoxirribosa. Es la principal molécula que contiene información genética.

ADN polimerasa: Enzima que agrega nucleótidos a una cadena de ADN en crecimiento en sentido 5' → 3' durante la replicación. Como modelo o plantilla de copiado, la enzima se vale de una cadena de ADN preformada.

Alelo: Uno de los posibles estados mutacionales de un gen, diferente de otros alelos por sus efectos fenotípicos.

Alelos múltiples: Tres o más alelos del mismo gen.

Aminoácidos: Cualquiera de las subunidades que se unen covalentemente para formar las proteínas.

Bases de datos: Es una colección de perfiles de tipificación de ADN de individuos previamente seleccionados o seleccionados al azar.

Cebador: Secuencia corta de nucleótidos, que proporciona el punto de iniciación para que la polimerasa copie una secuencia de nucleótidos y elabore una doble cadena.

Centrómero: Región especializada de un cromosoma en que se enganchan las fibras del huso en la división celular. La localización del centrómero determina la forma del cromoso-

ma durante la anafase de la división celular. También se conoce como constricción primaria.

Cromosoma: En procariontes, molécula de ADN intacta que constituye el genoma; en eucariotas, molécula de ADN acomplejada con RNA y proteínas para formar una estructura filamentosa en donde se encuentra la información genética dispuesta en secuencia lineal.

Desnaturalización: Es el proceso en el cual el ADN o ARN se convierte desde la cadena doble al estado de cadena sencilla; la separación de las cadenas se consigue sobre todo mediante calentamiento.

Duplex o doblete: complejo de dos cadenas complementarias de ácidos nucleicos.

Electroforesis: Técnica utilizada para separar una mezcla de moléculas por su migración diferencial en una fase estacionaria sometida a un campo eléctrico.

Enzimas de restricción: Son las que reconocen secuencias cortas específicas de ADN y rompen el dúplex (a veces en un sitio diana, a veces en otro, dependiendo del tipo).

Equilibrio genético: Mantenimiento de las frecuencias alélicas en el mismo valor durante generaciones sucesivas. Situación en que las frecuencias alélicas ni aumentan ni disminuyen.

Exón: Segmento de un gen que está presente en el ARN totalmente maduro después de la transcripción.

Fenotipo: Características observables de una célula o un organismo que son el resultado de la expresión del genotipo celular.

Frecuencias alélicas: Medida de la proporción de individuos de una población que lleva un alelo concreto.

Frecuencias genéticas: Porcentaje de alelos de un tipo dado en una población.

Gen: Unidad de herencia que especifica un ARN o ARNm. Un gen también contiene regiones intrónicas y regiones que controlan la transcripción.

Genoma: Conjunto de genes que lleva un individuo.

Genotipo: Alelo concreto o constitución genética de un organismo; a menudo, la composición alélica de uno o de un número limitado de genes sujetos a investigación.

Heterocigoto: Alude a una célula diploide o un organismo diploide que contiene diferentes alelos de un gen debido a la pérdida de un cromosoma de un par de homólogos.

Hibridación: Alude a la capacidad de las moléculas complementarias de ARN o ADN monocatenario para formar un dúplex.

Histonas: Grupo de proteínas básicas conservadas que en las células eucarióticas le dan al ADN la estructura cromatínica básica.

Homocigoto: Individuo con alelos idénticos en uno o más loci. Tales individuos darán lugar a gametos idénticos y por consiguiente serán raza pura.

Intrón: Porción de ADN entre regiones codificantes de un gen que se transcribe pero que no aparece en el mRNA maduro.

Ley de Hardy - Weinberg: Principio según el cual las frecuencias genéticas y genotípicas permanecen en equilibrio en una población

infinitamente grande en ausencia de mutación, migración, selección y de apareamiento no aleatorio.

Locus: Lugar de un cromosoma en donde se localiza un gen dado.

Marcadores moleculares: Son regiones de genes o cromosomas fácilmente detectadas y usadas para identificación.

Mutación: Cambio transmisible en una secuencia de nucleótidos que conduce a una alteración o la pérdida de la función normal codificada por esa secuencia de nucleótidos.

Nucleótidos: Nucleósido unido covalentemente a un grupo fosfato. Los nucleótidos son las piezas de construcción básicas de los ácidos nucleicos. Los nucleótidos que normalmente se encuentran en el ADN son el ácido desoxiadenílico, el ácido desoxicitidílico, el ácido desoxiguanílico y el ácido desoxitimidílico. Los nucleótidos de RNA son el ácido adenílico, el ácido citidílico, el ácido guanílico y el ácido uridílico.

Oncogen: Gen cuya actividad promueve la proliferación de células eucariotas.

Par de bases: Par de nucleótidos (A y T o G y C) en cadenas opuestas de la molécula de ADN que están unidos por puentes de hidrógeno.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PLFR o RFLP, del inglés, restriction fragment length polymorphism): Variación en la longitud de fragmentos de ADN generados por endonucleasas de restricción. Estas variaciones están causadas por mutaciones que crean o suprimen sitios de corte de enzimas de restricción. Los RFLP se heredan de manera codominante y pueden utilizarse como marcadores genéticos.

Polimorfismo: Existencia de dos o más fenotipos discontinuos que segregan en una población.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP o PCR, del inglés, polymerase chain reaction): Método para amplificar segmentos de ADN, que utiliza ciclos de desnaturalización, de emparejamiento a cebadores y de síntesis de ADN dirigida por la ADN polimerasa.

Repeticiones cortas en tándem (RCT o STR, del inglés Short Tandem Repeats): Es una repetición concatenada en la cual las unidades repetitivas son de tres, cuatro o cinco pares de bases.

Repeticiones en tándem de número variable (RTNV o VNTR, de inglés, variable number tandem repeat): Secuencias cortas de ADN (de 2 a 20 nucleótidos) presentes como repeticiones en tandem entre dos sitios de enzima de restricción. La variación en el número de repeticiones crea fragmentos de ADN de longitud diferente tras digerir con enzimas de restricción.

Telómero: Es el extremo natural de un cromosoma

OTRAS PUBLICACIONES PERIÓDICAS DE LA UCA



Envío. Es una revista de análisis político y de estudios socio-económicos. Posee un enfoque predominantemente nacional (Nicaragua) y regional (México, Centroamérica y el Caribe), pero aborda con regularidad temas sobre el nuevo orden internacional y ecología. Aparece cada mes y se publica en español, inglés e italiano. Dirección: Revista Envío. Apdo. postal A-194, Managua, Nicaragua. Tel: (505) 278-2557 / 277-4888. Fax: (505) 277-2583. E-mail: envio@ns.uca.edu.ni



Revista de Historia. Es una publicación semestral del Instituto de Historia de Nicaragua y Centroamérica (IHNCA). Difunde los resultados de las investigaciones sobre la historia de Nicaragua y la región centroamericana realizadas por sus propios investigadores o por historiadores de otras instituciones nacionales o extranjeras. Dirección: Instituto de Historia de Nicaragua y Centroamérica. Apdo. postal C-186, Managua, Nicaragua. Tel: (505) 278-7317 / 278-7348. Fax: (505) 278-7342. E-mail: ihn@ns.uca.edu.ni



Wani. Es una revista especializada en la Costa Atlántica de Nicaragua. Sus artículos abordan el estudio de la sociedad, la cultura, la economía, la historia y los recursos naturales del Caribe nicaragüense. Es una publicación trimestral editada por el Centro de Investigación y Documentación de la Costa Atlántica (CIDCA). Dirección: CIDCA. Apdo. postal A-189, Managua, Nicaragua. Tel.: (505) 278-0854 / 278-4930. Fax: (505) 278-4089. E-mail: cidca@ns.uca.edu.ni



Taller de Historia. Aparece dos veces al año. Es editada por el Instituto de Historia de Nicaragua y Centroamérica (IHNCA). Contiene textos y materiales bibliográficos destinados a servir de apoyo pedagógico a la enseñanza de la historia en las instituciones de Educación Superior. Dirección: Instituto de Historia de Nicaragua y Centroamérica. Apdo. postal C-186, Managua, Nicaragua. Tel.: (505) 278-7317 / 278-7348. Fax: (505) 278-7342. E-mail: ihn@ns.uca.edu.ni



Cuadernos de investigación de Nitlapán. Recogen los resultados de las investigaciones realizadas por el Instituto Nitlapán. Es una publicación de carácter monográfico, especializada en temas económicos. Dirección: Instituto Nitlapán. Apdo. postal A-242, Managua, Nicaragua. Tel.: (505) 278-0627-28 y 278-1343-44. Fax: (505) 267-0436. E-mail: cedoc@ns.uca.edu.ni



Revista Encuentro. Fundada en el año de 1968, *Encuentro* es una publicación de la Universidad Centroamericana (UCA) de Managua. Es una revista con un perfil académico y científico, destinada a investigadores, profesores y estudiantes de la educación superior. El tema de cada número es establecido por el consejo Editorial de la revista. Se aceptan artículos que sean el resultado de investigaciones empíricas o de reflexiones teóricas o filosóficas sobre cualquier aspecto de la realidad nicaragüense. Dirección: Revista Encuentro. Apartado postal No. 69, Managua, Nicaragua. Teléfonos: (505) 278-3023 27 ext. 192 y 236. Fax: (505) 267-0106. Correo electrónico: ncapubli@ns.uca.edu.ni



UCA



Publicaciones