

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Frecuencia genética de seis loci en el distrito de  
Ayacucho; determinados mediante Reacción en  
Cadena de la Polimerasa (PCR) y Dot Blot Reverso -  
2003**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO**

**CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bachiller OCHOA DEL PINO, Abel**

**Ayacucho – Perú**

**2012**

## DEDICATORIA

*Con humildad, cariño y gratitud  
a mis padres Humberto y  
Margarita*

*A mis queridos hermanos:  
Oscar, John, Maida y Fania*

*A quienes confiaron en mí*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en forma muy especial a los profesores de la Escuela de Formación Profesional de Biología por los conocimientos impartidos para forjar mi profesión.

Mi sincero agradecimiento a la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú – Lima, en especial al Laboratorio de Biología Molecular por la colaboración en la utilización de sus ambientes para la realización del presente trabajo de tesis.

A los peritos biólogos del Laboratorio de Biología Molecular por sus enseñanzas y adiestramiento de las técnicas de trabajo para obtener buenos resultados.

Con gratitud, a mi asesor Dr. Homero Ango Aguilar, por brindarme su tiempo y apoyo desinteresado para la culminación del presente trabajo de investigación, de igual manera al Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich.

## INDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE	iv
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 CONCEPTOS BÁSICOS DE LA GENÉTICA HUMANA	8
2.1.1 CROMOSOMAS	9
2.1.1.1 Cromosomas Homólogos	10
2.1.1.2 Fenotipo y Genotipo	11
2.1.2.3 Gen	12
2.1.2.4 Alelos	13
2.1.2 ADN: MOLÉCULA DE LA HERENCIA	14
2.1.2.1 Estructura del ADN	15
2.1.2.1.1 Estructura del Genoma	17
2.1.2.2 Funciones y Características del ADN	18
2.1.2.3 Variabilidad del ADN	19
2.1.2.4 Polimorfismos	20
2.1.2.4.1 Polimorfismos de secuencia	21
2.1.2.4.2 Polimorfismos de longitud	21
2.1.2.5 Marcadores Genéticos	23
2.1.2.5.1 Sistema HLA	23
2.1.2.5.2 Sistema PolyMarker	24
2.1.2.2.3 Otros Sistemas: VNTRs y STRs	25
2.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	25
2.2.1 ETAPAS DE LA PCR	27
2.2.1.1 Desnaturalización	27
2.2.1.2 Hibridación	27
2.2.1.3 Extensión	28
2.2.2 COMPONENTES DE LA PCR	28
2.3 TECNOLOGÍA FTA <sup>™</sup>	30
2.4 TIPADO MEDIANTE DOT BLOT: SONDAS DE HIBRIDACIÓN	31
2.5 FRECUENCIAS GENÉTICAS	32

2.5.1 Variación Poblacional	32
2.5.2 Tipificación Poblacional	32
2.6 GENES EN POBLACIONES	33
2.7 CÁLCULOS DE INTERÉS PARA EL ESTUDIO POBLACIONAL	33
2.7.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg	33
2.7.2 Prueba de Chi Cuadrado ( $\chi^2$ )	34
2.7.3 Poder de Discriminación (PD)	34
2.7.4 Probabilidad de Coincidencia (PC)	35
2.7.5 Probabilidad de Exclusión a Priori (PE)	35
2.8 BANCO DE DATOS GENÉTICOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
IV. RESULTADOS	47
V. DISCUSIÓN	60
VI. CONCLUSIONES	66
VII. RECOMENDACIONES	68
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	72

**Frecuencia Genética de seis loci en el distrito de Ayacucho; determinados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Dot Blot reverso.**

**Bach. en Ciencias Biológicas**

**: Abel Ochoa Del Pino**

**Asesores**

**: Dr. Homero Ango Aguilar.**

**Blgo. Tomás Miranda Tomasevich**

**RESUMEN**

El presente trabajo se realizó con el objetivo de obtener la frecuencia genética de seis loci en la población del Distrito de Ayacucho. La muestra estuvo conformada por 50 personas seleccionadas en forma aleatoria, para tipificar a cada individuo y determinar locus polimórficos y comunes. El ADN obtenido fue de sangre capilar tomadas en tarjetas FTA<sup>TM</sup>, y procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular ADN de la Dirección de Criminalística PNP – Lima asimismo fue complementada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La amplificación se realizó por PCR y la tipificación por Dot – Blot utilizando el kit de amplificación y tipificación *AmpliType* PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kits<sup>TM</sup>. Se efectuó la lectura e interpretación de los resultados a través de la formación de puntos de color azul. Las frecuencias alélicas de los 6 marcadores moleculares, el poder de discriminación, la probabilidad de coincidencia, la probabilidad de exclusión, el test de Hardy – Weinberg, el test de correlación de Karlin y la prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ) fueron calculados estadísticamente, no encontrándose diferencias significativas en la prueba de Chi cuadrado en las frecuencias alélicas comparadas entre la población ayacuchana y la población peruana utilizando los marcadores: LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y GC; pero si una diferencia significativa con relación al marcador HLA-DQA1. En la comparación con poblaciones hispanoamericanas se calculó que hay diferencias significativas en los marcadores HLA-DQA1, LDLR, HBGG y GC, y no hay diferencias significativas en los marcadores GYPA y D7S8. Los valores calculados de la combinación de los 6 marcadores moleculares para el poder de discriminación fue 0.9991934, la probabilidad de coincidencia fue 0.0008066 y la probabilidad de exclusión fue 0.7462040. Asimismo no se encontró desviación significativa en el equilibrio de Hardy – Weinberg de los 6 marcadores moleculares estudiados en la población ayacuchana.

**Palabras claves:** Marcadores moleculares, loci, tipificación por Dot Blot.

## I. INTRODUCCIÓN

En los organismos vivos, la información hereditaria es almacenada en el **ácido desoxirribonucleico (ADN)**, constituyendo este un material genético primordial, a excepción de algunos virus que almacenan su información genética en el ácido ribonucleico (ARN). El modelo postulado por Watson y Crick sobre la estructura del ADN les permitió proponer, a la vez, un mecanismo de replicación: ya que las dos cadenas son complementarias, durante la replicación podría producirse la separación de las cadenas de la molécula, constituyendo cada una un molde sobre el que se sintetizaría la cadena hija, complementaria (De Robertis, 1997).

Los marcadores genéticos del ADN se basan en la gran variabilidad de la secuencia de nucleótidos del genoma humano. Los primeros marcadores conocidos fueron los segmentos largos polimórficos de restricción o fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), formados por ADN de varios miles de pares de bases que se expanden entre ciertas secuencias, sitios en los que las enzimas de restricción cortan y originan diferencias en el tamaño, luego se pueden separar por electroforesis según el tamaño y posteriormente se procede a la hibridación con sondas adecuadas (Bravo, 1999) (Lorente y Lorente, 1995).

Estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* ("Polymerase Chain Reaction" o PCR), emplean iniciadores o *primers*, que son secuencias de ADN complementarias de las zonas flanqueantes de la zona de interés, que es amplificado por un ADN polimerasa durante ciclos térmicos adecuados, lográndose millones de copias de la región. En los primeros trabajos con utilización de las técnicas de PCR, si bien resultaba posible evaluar regiones de una muestra de ADN que podía estar muy degradada, la escasa variabilidad entre los individuos componentes de la población general conspiraba contra la certeza del análisis. A partir de 1990 la posibilidad de evaluar un gran número de sitios variables localizados en diferentes zonas del genoma, permitió analizar, aunque fuera parcialmente muestras de tejido humano. Posteriormente, la incorporación de un número aún mayor de sistemas hizo posible el establecimiento de vínculos biológicos de parentesco a través de secuencias de ADN de muy pequeño tamaño, con lo cual se logró la identificación. La PCR puede considerarse, en la práctica, simplemente como una técnica de preparación de muestras. Permite estudiar cantidades subanalíticas de ADN, teniendo mayor sensibilidad y especificidad, disminuyendo el tiempo de trabajo y eliminando todo tipo de material radioactivo (INS, 1998).

La difusión de las noticias relacionadas con la aplicación de la metodología del ADN a la resolución de los casos prácticos que se presentan ha hecho que la frase "*el ADN es la clave de la investigación*" pase a ser de uso común. Desde el ámbito científico, no cabe duda que el análisis de los polimorfismos del ADN no es una prueba más, ya que por sus características ha supuesto una importante modificación cualitativa y cuantitativa en la investigación (Andradas, 1995).

El ADN es el material genético que conforma el código para determinar las características de los individuos. Excepto los gemelos univitelinos, cada individuo



posee un código de ADN que es único. Los test de identidad con ADN se basan en las diferencias genéticas existentes entre los individuos. Hay una serie de técnicas de biología molecular que pueden analizar las características únicas del ADN de tal modo que se puedan diferenciar a los individuos (Bravo, 1999).

Se ha demostrado ampliamente la validez que tiene el aplicar la regla de la multiplicación de las frecuencias encontradas en los diferentes loci analizados, que exige la existencia de un equilibrio de Hardy - Weinberg y un equilibrio de la fase gamética, todo ello usando como referencia frecuencias alélicas procedentes de bases de datos de la población general. Además, la existencia de tecnologías basadas en la aplicación de la PCR permite generar bases de datos poblacionales de modo rápido y relativamente sencillo, obteniéndose una "foto" basada en la estructura y distribución ínter poblacional de los diferentes marcadores de ADN (García y col. 2002).

Para realizar la frecuencia genética de diferentes loci en la ciudad de Ayacucho, las cuales han sido determinados mediante PCR y Dot Blot reverso, se han trazado los siguientes objetivos:

- Determinar las frecuencias alélicas de los seis loci y tipificar a cada individuo en base a los siguientes marcadores: HLA, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y GC, mediante la PCR y Dot Blot reverso.
- Determinar los cálculos de interés para un estudio poblacional como el poder de discriminación, la probabilidad de coincidencia y la probabilidad de exclusión.
- Determinar cuáles de los locus son más polimórficos y comunes dentro de la población de Ayacucho.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Los primeros marcadores genéticos que se utilizaron como elementos fueron los antígenos de los eritrocitos. En 1921 el científico Ottemberg propuso la utilización de los grupos sanguíneos del sistema ABO para el análisis genético de la paternidad; sin embargo, otros investigadores cometieron errores de tipificación y, por tanto, en los resultados del análisis de segregación en las genealogías, lo cual les hizo pensar que los alelos A y B son el producto de dos genes independientes. Berntein demostró el error de la hipótesis mediante evidencias del alelismo del sistema ABO; también probó que este sistema se encuentra en equilibrio de Hardy – Weinberg en la población (Bravo, 1999).

Desde entonces se ha incorporado un gran número de marcadores genéticos clásicos como grupos sanguíneos, proteínas del plasma, enzimas de los eritrocitos y antígenos de los leucocitos humanos, HLA. Sin embargo, el hecho que más ha influido en la heredobiología es el descubrimiento de la estructura molecular del ADN en 1953 por Watson y Crick, lo cual constituyó una de las grandes conquistas científicas del siglo XX. Este descubrimiento ha influido en todas las ciencias de la vida, abrió las puertas de la ingeniería genética, la cual dio paso al proyecto del genoma humano (Bravo, 1999).

La variabilidad existente en el genoma de los individuos unido a técnicas de Biología Molecular ha proporcionado al científico, métodos poderosos para el perfil del ADN, cuyo potencial total no ha sido alcanzado, a pesar de la crítica del sistema actual del análisis de ADN, el cual tiene un sistema analítico que se apoya en los principios científicos (Chieri, 1999).

Los primeros trabajos, publicados a mediados de los años '80, emplearon fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas, separados por electroforesis y transferidos a un soporte sólido, el cual se trataba con una sonda constituida por secuencias complementarias de las regiones variables, por autorradiografía, resultaba posible observar múltiples bandas de localización desconocida dentro del genoma, pero que eran características de cada individuo y se heredaban de padres a hijos. Si bien las bandas producidas por estas sondas multilocus eran muy variables de una persona a otra, los resultados eran difícilmente reproducibles, ya que pequeñas y poco controlables diferencias de la corrida electroforética (voltaje, tiempo, concentración del gel) afectaban en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados (Andradas, 1995).

Los **Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLPs)** son grandes fragmentos de ADN (de megabases) que pueden ser adecuadamente cortadas con una serie de enzimas – seleccionables según los estudios que se pretendan – de modo que luego se pueden separar por electroforesis; se utilizan muy poco en pruebas de paternidad y en la identificación de los individuos debido a lo dispendioso de las técnicas de tipificación y a que son bialélicos (Bravo, 1999).

El descubrimiento de regiones hipervariables del genoma **Repeticiones en Tandem de Número Variable (Variable Number of Tandem Repeats - VNTR)** con localización específica permitió el desarrollo de las sondas de unilocus que resolverían el problema, posibilitando el estudio de una zona conocida del

genoma que se visualizaba como dos únicas bandas para la condición heterocigoto, correspondientes cada una a un alelo, heredado de cada progenitor. La revolución llegó con el desarrollo de técnicas de amplificación de secuencias pequeñas de ADN mediante la PCR; con los cuales fue posible implementar sistemas de análisis denominados **Microsatélites** o **Repeticiones Cortas en Tandem** (Short Tandem Repeats – STR), que son secuencias repetidas de 2 – 4 nucleótidos, de ADN no codificante de función aún incierta, el cual a diferencia de los VNTR puede ser utilizada para muestras degradadas (García y col. 2002).

Los **Microsatélites** o **Secuencias Cortas Repetidas (STR)** son secuencias de dos, tres, cuatro y hasta seis pares de bases, repetidas una a continuación de otra, por ejemplo, AATA AATA AATA ... AATA, n veces. Estas secuencias están esparcidas en gran número en todo el genoma humano. Prácticamente se ha encontrado una secuencia STR cada 15,000 pb. Son altamente polimórficas y su variabilidad está dada por el número de repeticiones (Bravo, 1999).

Se han identificado segmentos cortos de ADN que constituyen partes de genes y presentan gran polimorfismo neutro debido a sustituciones de un solo par de bases, conocidos como **Marcadores genéticos de polimorfismo sustitucional** - marcadores que utilizaremos en el presente trabajo de tesis - estos sistemas de marcadores ofrecen dos grandes ventajas: primero, la tipificación es relativamente sencilla por el tamaño reducido del segmento que contiene las sustituciones, puede ser amplificado por la técnica de PCR y la tipificación de este ADN es automatizada; segundo, el valor informativo de los marcadores del HLA es de los más elevados que se conoce, debido al gran número de alelos y a su distribución en la población (Bravo, 1999).

En la actualidad se están utilizando nuevos marcadores genéticos de ADN fuera de los ya mencionados y que desarrollaremos a modo de información:

**Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP):** los PNU (“Single Nucleotide Polymorphisms”, SNP) son la forma más sencilla de polimorfismo genético ya que consiste en el cambio de un solo nucleótido en el contexto de una secuencia genética. Se distribuyen de manera heterogénea por todo el genoma y se encuentran tanto en las regiones codificantes (exones) como no codificantes (intrones y región promotora) de los genes así como en las zonas del genoma en donde no asientan genes conocidos (a veces llamado “ADN basura”). Se han descrito varios millones de SNP distribuidos por todos los cromosomas humanos, estimándose que su frecuencia media, aunque con grandes variaciones según cromosomas y regiones dentro de ellas es de 1 SNP cada 500 – 1000 nucleótidos. Se cree que se trata de mutaciones puntuales acaecidas en diferentes momentos de la historia evolutiva de la especie y que en su momento fueron estabilizadas en el genoma humano por conferir algún tipo de ventaja adaptativa al medio en ese momento (<http://www.allelyus.com>).

**InDels:** en múltiples regiones del genoma se producen fenómenos de inserción y delección (Indel) de uno o varios nucleótidos, de tal forma que el genoma de diversos individuos se diferencia en este aspecto, sin que sea posible saber si uno es el resultado de una delección o el otro se debe a una inserción. Los Indels son mucho menos frecuentes en las regiones codificantes que en las no codificantes (<http://www.allelyus.com>).

**Chip de ADN:** Un chip de ADN (del inglés **DNA microarray**) es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN. Las superficies empleadas para fijar el ADN son muy variables y pueden ser de vidrio, plástico e incluso de silicio. Los chips de ADN se usan para analizar la expresión diferencial de genes, monitorizándose los niveles de miles de ellos de forma simultánea. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica (probe, en inglés) y la molécula diana

(target), indicándose generalmente mediante fluorescencia y analizándose por análisis de imagen lo cual nos indicará el nivel de expresión del gen. Suelen utilizarse para identificar genes con una expresión diferencial bajo condiciones distintas. Por ejemplo, para detectar genes que producen ciertas enfermedades mediante la comparación de los niveles de expresión entre células sanas y células que están desarrollando ciertos tipos de enfermedades (<http://es.wikipedia.org>).

La población peruana ha empezado a ser estudiada a nivel molecular en los últimos años, es así que se tienen resultados obtenidos en poblaciones de Arequipa, Huancayo, Iquitos, Piura, Ancash y Lima con los marcadores de los Kit comerciales HLA-DQA1 + PolyMarker (HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y GC) y los STRs de *Profiler Plus* y *COfiler* (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, THO1, TPOX, CSF1PO y Amelogenina) (Pérez, 2002).

## **2.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE GENÉTICA HUMANA**

Todo ser vivo se origina de una sola célula. El organismo humano se inicia con el cigote, que es el resultado de la fusión del espermatozoide con el oocito, este último llamado también como óvulo. El cigote como todas las demás células, está formado por membrana celular, citoplasma y muchos tipos de organelas, entre ellas la mitocondria, los ribosomas y el núcleo. Este último es una de sus partes principales, y dentro de él, limitado por la membrana nuclear, se encuentra el material genético (Bravo, 1999).

Las bases que rigen la transmisión de los caracteres hereditarios deben buscarse en el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y en las consecuencias genéticas de este tipo de división (De Robertis, 1997).

### 2.1.1. CROMOSOMAS

Se denomina cromosoma a cada uno de los corpúsculos, generalmente en forma de filamentos, que existen en el núcleo de las células y controlan el desarrollo genético de los seres vivos. Cada cromosoma está constituido por una larga molécula de ADN, asociada a diversas proteínas. Según de qué cromosoma se trate, tal molécula puede contener entre 50 y 250 millones de pares de bases (De Robertis, 1997).

Los organismos superiores están constituidos por dos tipos de células: las somáticas, que forman los tejidos y las germinales, que producen los gametos – espermatozoides y oocitos – conteniendo el material genético organizado en corpúsculos denominados cromosomas, que en el caso de la especie humana, son 23 pares. En cada uno de los cromosomas hay genes, determinantes de las características biológicas, localizados en lugares específicos denominados, cada uno, *locus* – del latín que significa lugar, plural es *loci* – de estos cromosomas, los 22 pares autosómicos, numerados del 1 al 22 según normas internacionales son similares para los varones y para las mujeres. El par restante es el de los cromosomas sexuales: XX en la mujer y XY en el varón. Todos los cromosomas humanos están formados por dos brazos: uno largo, denominado *q*, y otro corto *p*, unidos por una constricción o estrangulamiento llamado centrómero. Cuando los cromosomas se duplican durante la división celular, mitosis o meiosis, el centrómero se hace visible y los dos filamentos del cromosoma duplicado, o diáda, toman el nombre de cromátidas. Cada par de cromosomas presenta un patrón típico de bandas oscuras y claras, según la sustancia con la cual se coloreen. La presentación ordenada de los cromosomas por parejas según su tamaño y forma se denomina cariotipo. Siempre se inicia con el par 1 y termina en el 22, luego se colocan los cromosomas sexuales (Bravo, 1999).

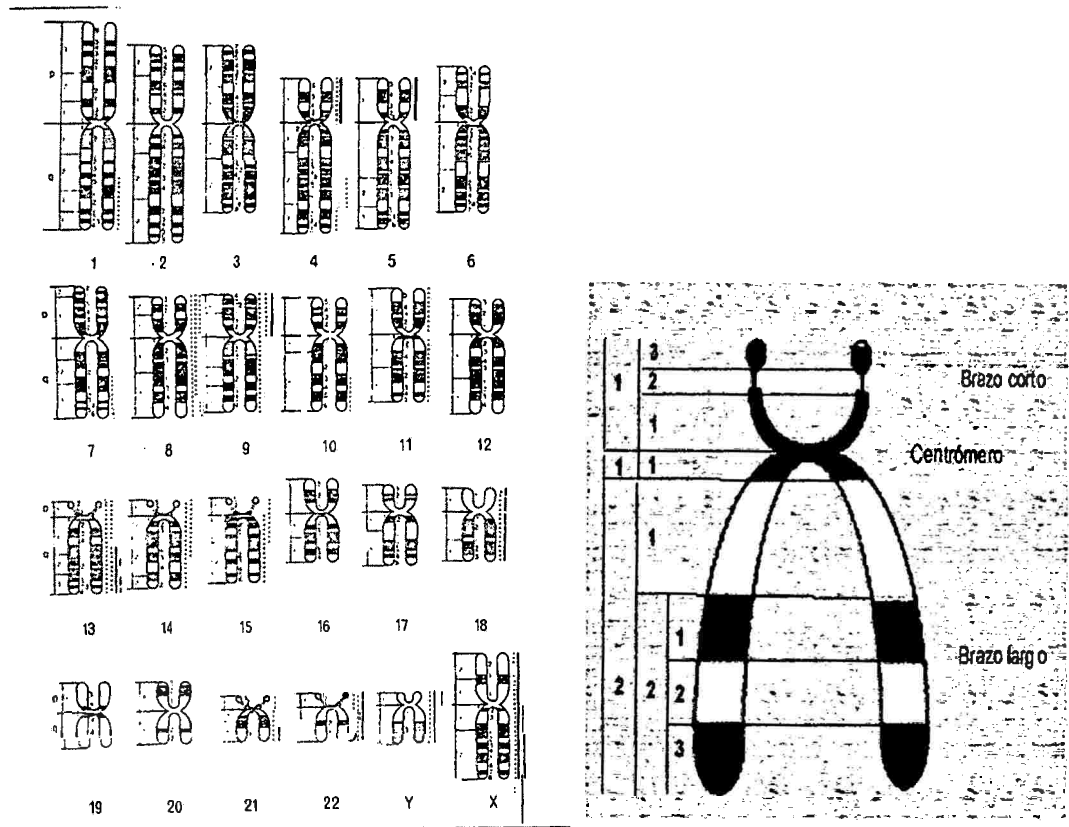


Figura: Diagrama que muestra el cariotipo humano (izquierda) y partes de un cromosoma (derecha)

Fuente: <http://www.iqb.es/cancer/g006.htm#b>

### 2.1.1.1. Cromosomas Homólogos

Los miembros de cada par de cromosomas se describen como homólogos y contienen los mismos genes. Un cromosoma de cada par homólogo es heredado del padre y el otro de la madre. Por tanto, para una característica determinada por genes que están en los cromosomas autosómicos y algunas veces en los sexuales, existen dos de éstos: uno de origen paterno y otro de origen materno; muchas veces varían molecularmente entre sí y se denominan alelos. Cuando ambos alelos son iguales en los cromosomas homólogos, se dice que el individuo es homocigótico, y heterocigótico cuando los alelos son distintos (Bravo, 1999).



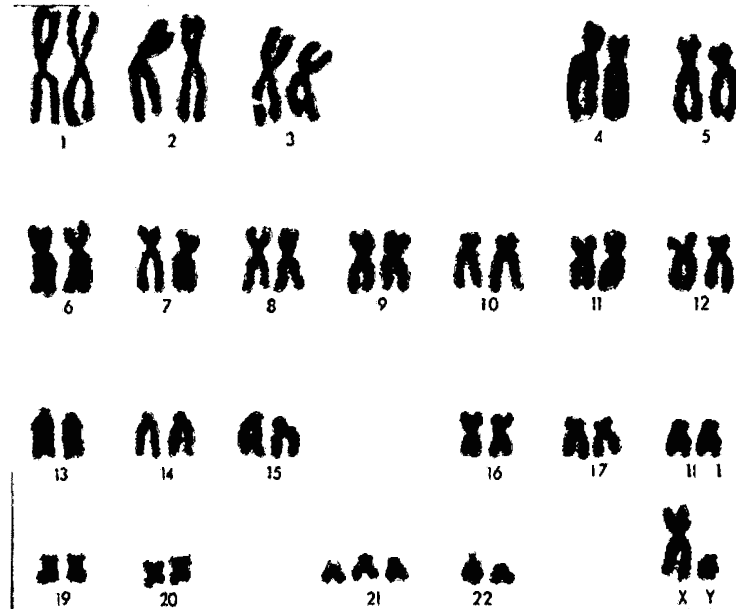


Figura: Cariotipo humano indicando los 23 pares de cromosomas.  
 Fuente: <http://www.iqb.es/cancer/g006.htm#b>

#### 2.1.1.2. Fenotipo y Genotipo

Los términos fenotipo y genotipo están relacionados con los anteriores conceptos, así, fenotipo es la forma como se manifiestan o aprecian los genes. El genotipo, en cambio, describe la constitución genética, o sea cómo son sus genes (Bravo, 1999).

Se propuso el término genotipo para la constitución genética y fenotipo para las características visibles del individuo. El concepto de fenotipo se extiende a todas las características que constituyen expresiones de los genes, tanto externas o visibles (por ejemplo el color de la piel, el color de los ojos, etc.) como a los que no son detectados mediante la observación directa (por ejemplo las distintas clases de hemoglobina, los grupos sanguíneos, etc.). Existen casos de herencia intermedia, se deben a que la dominancia es incompleta. En estas situaciones existe, por lo tanto, codominancia. En estos últimos se da un fenotipo con características intermedias respecto de los fenotipos de los progenitores, aunque sin que se mezclen los genes alelos (De Robertis, 1997).

### 2.1.1.3. Gen

Unidad de herencia, partícula de material genético que determina la herencia de una característica determinada, o de un grupo de ellas. Los genes están localizados en los cromosomas en el núcleo celular y se disponen en línea a lo largo de cada uno de ellos. Cada gen ocupa en el cromosoma una posición, o locus. Por esta razón, el término *locus* se intercambia en muchas ocasiones con el de *gen*. El material genético es el ácido desoxirribonucleico, o ADN, una molécula que representa la "columna vertebral" del cromosoma. El gen es la secuencia de nucleótidos que codifican una proteína. El gen es la unidad de estudio en genética, ya que contiene la información necesaria para determinar la herencia de los caracteres que conforman a las persona. La herencia de dichos caracteres puede ser monogénica (cuando depende de un solo gen) o poligénica (cuando depende de varios genes) (Lorente y Lorente, 1995).

Un gen está constituido, en la mayoría de los organismos, por la secuencia nucleotídica de dos tipos de segmentos: los exones, que contienen la información de la secuencia en que se unirán entre sí los aminoácidos, moléculas simples que conforman las proteínas, y los intrones, que separan a los exones. Por otra parte, en los extremos del gen están las secuencias reguladoras, que son algunas secuencias nucleotídicas que tienen como función determinar cuándo y cómo se activa y funciona un gen en una célula determinada. El tamaño de los genes varía considerablemente, según la extensión de la proteína que codifiquen (Bravo, 1999).

La totalidad de la información genética depositada en las moléculas de ADN lleva el nombre de genoma. El 75% del ADN se halla representado por secuencias singulares (copias únicas) de nucleótidos y secuencias que se hallan una o pocas veces repetidas. En este sector del ADN se encuentran las secuencias de nucleótidos funcionalmente activas, es decir, los genes. Estos

representan una pequeña parte del ADN – alrededor del 13% de ese 75% - lo que equivale al 10% de todo el genoma. Precisamente uno de los mayores desafíos para los biólogos moleculares es descifrar las funciones del ADN ajeno a los genes. El 25% restante del ADN se halla representado por secuencias de nucleótidos altamente repetidas. Sus funciones se desconocen, aunque no se descarta que desempeñen algún papel en el mantenimiento de la estructura de los cromosomas (De Robertis, 1997).

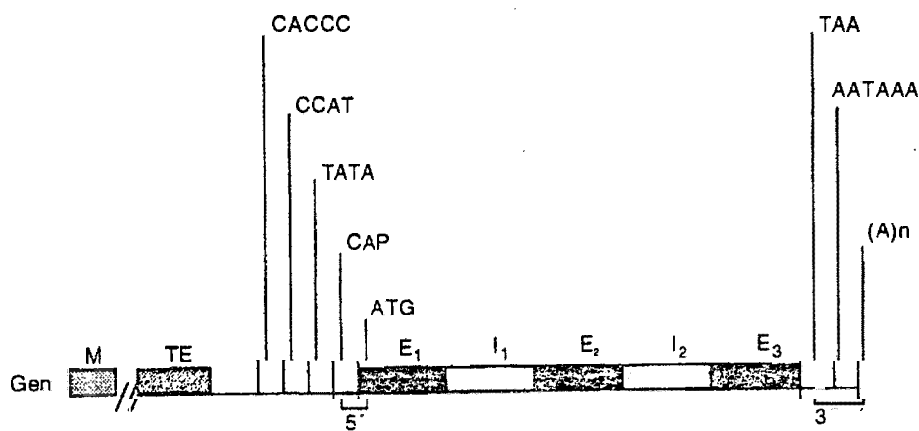


Figura: Esquema que muestra la organización molecular de un gen con sus secuencias reguladoras de la expresión. M, TE, CACCC, CCAT, TATA, CAP, ATG, TAA, AATAAA y (A)n son secuencias reguladoras; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y E<sub>3</sub> son exones; I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> son intrones; y 5' y 3' son los extremos de la secuencia del ADN del gen.

Fuente: Bravo, 1999.

#### 2.1.1.4. Alelos

Se denomina alelo a cada una de las formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus en un cromosoma homólogo y que controlan el mismo rango o carácter. También conocido como alelomorfo. Se denominan con una o más letras y algún símbolo. Son alelos dominantes, los que sólo necesitan una dosis para expresarse y se nombran con letras mayúsculas. Se llama alelo recesivo al que necesita doble dosis para expresarse, se simbolizan con letras minúsculas (Wallace, 1991).

El alelo es la forma en la que se manifiesta un fragmento de ADN en un lugar (locus) determinado, de entre todas las posibles. En identificación se estudian locus de ADN no codificante (que no contienen características propias de la persona o de sus capacidades físicas, fisiológicas o intelectuales). En los locus que se estudian se conocen a priori los alelos posibles que hay. El conjunto de los dos alelos que cada persona tiene para un locus determinado se denomina genotipo (Lorente y Lorente, 1995).

### **2.1.2. ADN: Molécula de la Herencia**

Una célula se define como la Unidad de la Vida, cada célula se origina de otra conteniendo así la misma programación genética. Dentro del núcleo celular se encuentra un material químicamente conocido como Ácido Desoxirribonucleico (ADN), organizado en cuerpos denominados cromosomas. Existe también ADN extranuclear y se encuentra en las mitocondrias, organelo que es fuente de energía celular. El ADN es la molécula fundamental y más importante de la vida, es la sustancia bioquímica encargada de transmitir y regular la vida de las diferentes especies, esta definición que bien puede considerarse ambigua por amplia e inespecífica, es totalmente válida para comprender el por qué de su uso para la identificación de cualquier ser vivo (Lorente y Lorente, 1995).

La replicación natural de la información genética ocurre en la división de la célula, el ADN de la célula madre se reproduce y pasa hacia las dos nuevas células, este ADN es la plantilla para hacer ARN y proteínas (Andradas, 1995).

El ADN nuclear se encuentra en todas las células del organismo (excepto en los eritrocitos, que carecen de núcleo). La cantidad de ADN por célula humana es aproximadamente  $6 \times 10^{-12}$  gramos es una cantidad muy pequeña pero la información que lleva es enorme. El ADN provee toda la información necesaria

para “hacer” un organismo. Todo el ADN dentro de una célula se denomina genoma (Budowle y Brown, 2001).

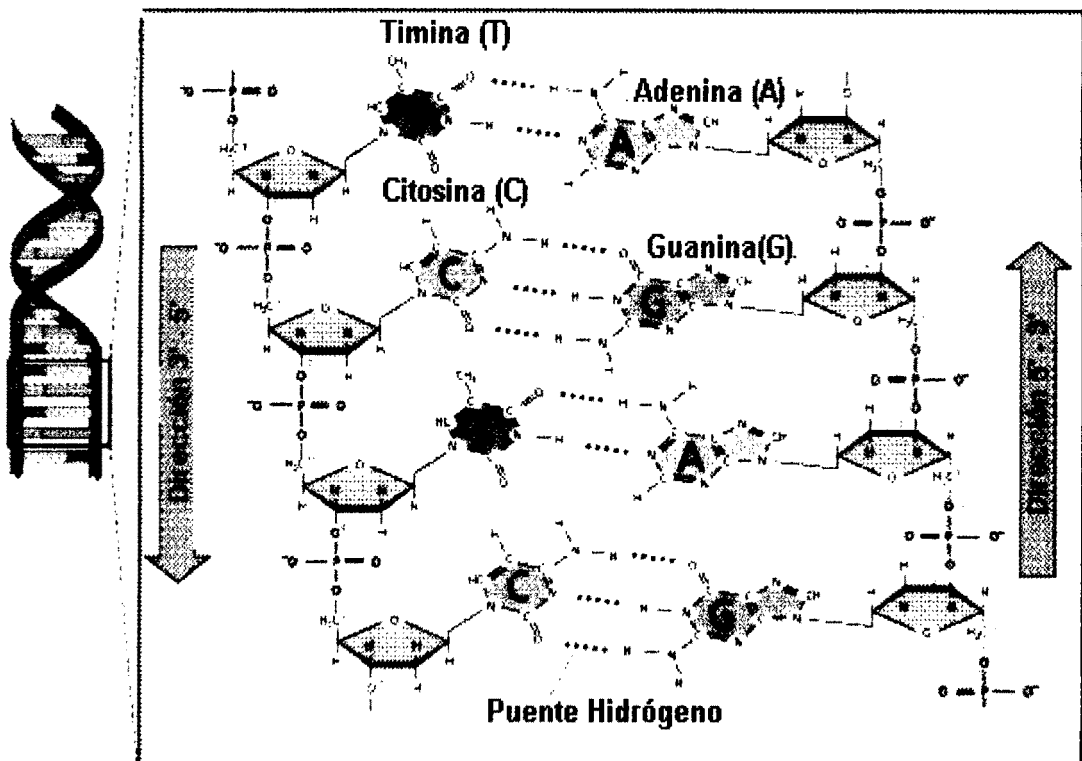
#### **2.1.2.1. Estructura del ADN**

El ADN corresponde a una molécula capaz de albergar la totalidad de información genética y se encuentra en todos los seres vivos, se localiza en el núcleo celular, compactado formando un verdadero ovillo, asociado a unas proteínas denominadas **histonas** constituyendo la estructura conocida como **chromosoma**. El ADN se asemeja a una larga cadena, cuyos eslabones corresponden a sus unidades básicas denominadas **nucleótidos**. Cada nucleótido está formado por tres elementos: **azúcar** del tipo desoxirribosa, al que están unidos dos componentes un **grupo fosfato** y una **base nitrogenada** (García y col. 2002).

Una larga secuencia de nucleótidos forman una cadena de **ADN**, la cual se aparea en forma complementaria a otra cadena antiparalela, que se mantienen unidas entre sí mediante enlaces débiles, puentes de unión establecidos entre las bases de manera que se forma la doble hélice del ADN, molécula gigantesca conformada por dos cadenas poliméricas que se unen por puentes de hidrógeno y dan lugar a una estructura semejante a una escalera que se enrolla sobre sí misma en hélice. El único elemento que varía en la molécula es la base nitrogenada que pueden ser adenina, timina, citosina y guanina, conocidas por sus iniciales **A, T, C** y **G**, por tanto el **ADN** no es más que una sucesión concadenada de los cuatro nucleótidos (Bravo, 1999).

Así, si en una cadena hay una **A** en una posición dada, en la cadena complementaria debe haber una **T** en la misma posición y viceversa. Lo mismo para el otro par de nucleótidos, si en una cadena hay una **C** en una posición, en la otra cadena debe haber una **G** para la misma posición y viceversa. Entonces,

la regla de complementariedad describe que la cantidad total de G es igual a C, y la cantidad total de A es igual a T. La dirección de la secuencia de ADN se designa del terminal 5' al terminal 3'. Este esquema proviene de la estructura química del ADN referida a la posición de los átomos de carbono en el anillo del azúcar. Las dos cadenas son antiparalelas, es decir, una cadena está en la orientación 5' a 3' y la otra de 3' a 5' en dirección relativa a la primera cadena. Así, conociendo la consecuencia de una cadena se puede determinar fácilmente la secuencia de la otra cadena, basándose en la regla de la complementariedad (Yunis y Yunis, 2002).



Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/adn/adntema1.htm>

Un enlace fosfodiéster es un tipo de enlace covalente que se produce entre un grupo hidroxilo (OH) en el carbono 3' y un grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en el carbono 5' del nucleótido entrante, formándose así un doble enlace éster (García y col. 2002).

El orden en que se unen estos eslabones en la cadena (los nucleótidos) unos a otros forman lo que se denomina **secuencia** y tiene gran importancia, pues de ella depende el mensaje genético que será traducido a una proteína determinada para un gen dado (Bravo, 1999).

El total de ADN de un organismo se denomina **Genoma**, existen aproximadamente 100 a 300 millones de nucleótidos por cada cromosoma con un total de 12 billones de nucleótidos por genoma diploide, de esta forma el cromosoma representa la unidad organizacional mayor del genoma y el nucleótido a la unidad más básica (Lorente y Lorente, 1995).

#### **2.1.2.1.1. Estructura del Genoma**

Podemos comparar al genoma celular con un manual de instrucciones para la fabricación o síntesis de moléculas estructurales y funcionales denominadas proteínas, usando la misma analogía podría decirse que la síntesis de cada proteína está codificada por un segmento de ADN, cada uno de estos segmentos con instrucciones precisas para la síntesis de proteínas se denomina **GEN** (García y col. 2002).

**ADN codificante**, unos pocos segmentos del ADN pueden ser expresados físicamente como proteínas y a este se le conoce como ADN codificante. Se calcula que en el genoma humano existirían aproximadamente unos 30.000 genes de una longitud entre 5.000 a 10.000 pares de bases (pb). Además, el ADN contiene secuencias de señal para una variedad de procesos como la regulación de la expresión genética, la replicación del ADN, empacamiento y segregación de los cromosomas. Incluyendo el ADN espaciador, las secuencias de señal y el ADN codificante constituyen aprox. un 70 a 80% del total del genoma humano, en este ADN reside la determinación de todas las características físicas de un individuo (Andradas, 1995) (García y col. 2002).

**ADN no codificante**, el restante 20 a 30% consiste en el denominado ADN silencioso o ADN basura, términos poco precisos para referirse al ADN no codificante de función específica desconocida en la actualidad, jugando un papel importante en la estructura y función de los cromosomas sobre todo actuando como puntos calientes de recombinación. Gran parte de este ADN corresponde a secuencias repetidas, las cuales presentan una alta variabilidad entre diferentes individuos; hasta ahora, la mayoría de los marcadores empleados en identificación humana (pruebas de ADN) utilizan este ADN no codificante, por tanto los datos obtenidos en una prueba de este tipo no están asociados en modo alguno con aquellas características del ADN codificante (García y col. 2002).

#### **2.1.2.2. Funciones y Características del ADN**

El ADN tiene dos funciones: la autoduplicación y la síntesis de proteínas. Esta última la cumple mediante los genes, los cuales se definen como segmentos del ADN que dan lugar a productos primarios funcionales, los cuales pueden ser proteínas. Éstas a su vez, intervienen en muchos procesos fisiológicos y determinan en gran parte las características de los organismos. Una secuencia de nucleótidos en el ADN, empezando de un punto dado es convertida en una secuencia única correspondiente de aminoácidos de acuerdo a reglas de un "diccionario" llamado código genético, el cual "traduce" los tripletes de nucleótidos en aminoácidos. Luego, estos aminoácidos forman secuencias que codificarán una determinada proteína. La molécula de ADN puede separar sus cadenas si se le somete a altas temperaturas o a álcalis fuertes, a este proceso se le conoce como "denaturación". Esta denaturación tiene como producto dos cadenas simples de ADN las cuales pueden ser cortadas en sitios específicos mediante enzimas de restricción (endonucleasas),



las cuales reconocen secuencias específicas en las cadenas simples originando fragmentos múltiples con tamaños diferentes. Para visualizar estos fragmentos es necesaria la separación por electroforesis o hibridación con una sonda complementaria para el segmento generado (Budowle y Brown, 2001).

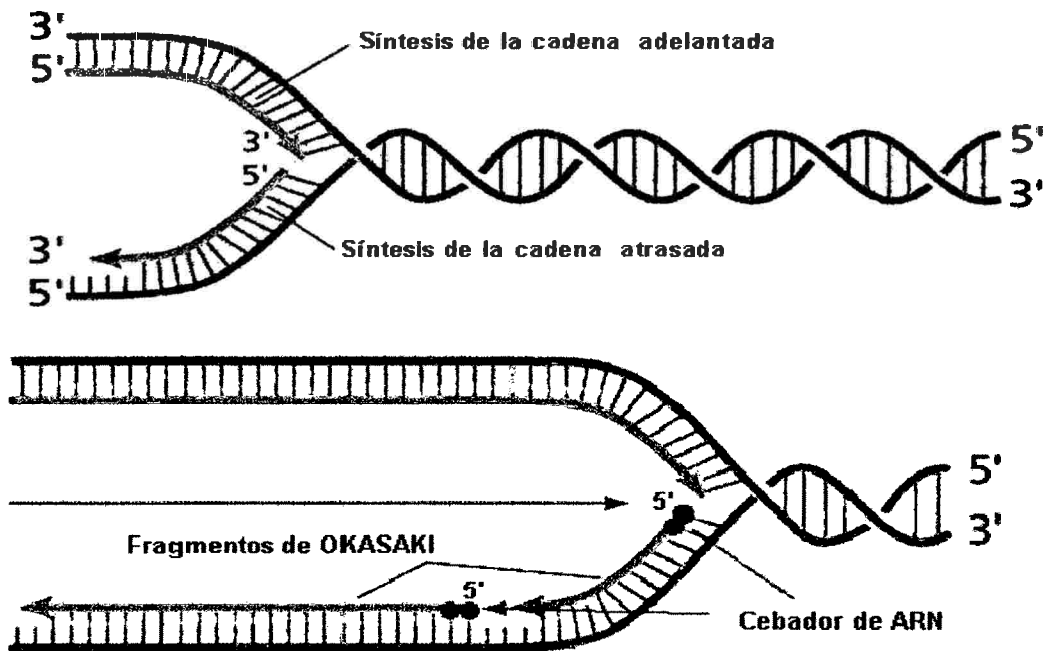


Figura: Replicación del ADN

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/adn/adntema1.htm>

### 2.1.2.3. Variabilidad del ADN

Resulta fácil darse cuenta de que a excepción de los gemelos monocigóticos, todos los individuos somos diferentes unos de otros, esta variabilidad proviene en primer término de la recombinación del material genético que ocurre durante la formación del nuevo ser. En segunda instancia, el material genético parental recombinado producirá algunos pequeños cambios en la expresión de ciertas proteínas, lo que dará lugar físicamente a las variaciones. Sin embargo, si comparamos el material genético activo o codificante (los genes) con aquel contenido en el ADN silencioso, en este último concentra la mayor variabilidad.

Los genes han evolucionado a través de milenios, perfeccionándose en este proceso hasta dar como resultado proteínas altamente eficientes, cualquier modificación en el gen, podría afectar negativamente la funcionalidad de la proteína codificada, lo que traería como consecuencia para el organismo una enfermedad o la muerte, dependiendo de la importancia de la función que cumple la proteína involucrada. Esto implica que el ADN codificante posee una restricción evolutiva a la variación debido a las graves consecuencias que la mutación puede tener sobre el organismo. Por el contrario, el ADN silencioso no codifica proteínas, por lo que el efecto de las mutaciones no afecta al individuo por ende los cambios en estas regiones del genoma se manifiestan libremente, acumulando las variaciones a través de la evolución de la vida del individuo (Andradas, 1995) (García y col. 2002).

Los marcadores variables (polimórficos), que difieren entre individuos pueden ser encontrados a lo largo de las regiones no codificantes del genoma humano. La posición cromosómica o locación cromosómica de un gen o un marcador de ADN en una región no codificante es referida comúnmente como un locus (plural=loci). Miles de loci han sido caracterizados y mapeados para regiones particulares de cromosomas humanos dentro del Proyecto Genoma Humano. La tipificación de ADN es el proceso de determinación de los genotipos presentes en regiones específicas en la molécula de ADN. La variabilidad que se observa es usada para incluir o excluir muestras (Budowle y Brown, 2001).

#### **2.1.2.4. Polimorfismos**

Las variaciones de las que hablamos se denominan Polimorfismos y estas pueden ser de dos tipos:

- Polimorfismos de secuencia
- Polimorfismos de longitud

**a. Polimorfismos de Secuencia**

Unos corresponden a cambios en la secuencia de nucleótidos de una región del ADN, ejemplo: aquí se observa que el individuo 1 posee una G en la quinta base de la secuencia, en cambio, el individuo 2 en su lugar posee una C.

INDIVIDUO 1: -----GTACGGTACGT-----

INDIVIDUO 2: -----GTACC GTACGT-----

Otro tipo de polimorfismo de secuencia puede ser la ausencia de una base en la secuencia, ejemplo: se observa que el individuo 2 carece de la quinta base G del individuo 1, este tipo de mutación se denomina delección.

INDIVIDUO 1: -----GTACGGTACGT-----

INDIVIDUO 2: -----GTAC GTACGT-----

(García y col. 2002).

Dentro de los polimorfismos de secuencia encontramos aquellos genes que codifican los grupos sanguíneos, el sistema HLA, el análisis de ADN mitocondrial, el sistema PolyMarker, entre otros (Yunis y Yunis, 2002).

**b. Polimorfismos de Longitud**

El segundo tipo de polimorfismo se encuentra representado principalmente por regiones de ADN repetitivo, este tipo de ADN corresponde a bloques de secuencias que pueden estar repetidas, ya sea de manera dispersa en el genoma o bien agregados en una zona determinada o en "tandem" a la manera de varios segmentos repetidos en forma sucesiva.

Ejemplo: ----- CCTATAGG CCTATAGG CCTATAGG CCTATAGG-----

Se observa en el ejemplo, un bloque de bases con la secuencia CCTATAGG que se repita consecutivamente cuatro veces en una región del ADN. Estos polimorfismos están constituidos por bloques de ADN de entre 5 a 250 bases, repetidas decenas a cientos de veces en forma consecutiva, la alta variabilidad de estas repeticiones genera diferentes formas o alelos en los cromosomas.

Según el tamaño de la secuencia repetida se han dividido en **regiones VNTR** y **STR** (Andradas, 1995) (García y col. 2002).

**VNTR:** (Variable Number of Tandem Repeats o Repeticiones en Tandem de Número Variable), cuando el tamaño de la secuencia repetida es entre 5 a 250 nucleótidos, conocidas como **ADN MINISATÉLITES**, cada unidad de repetición se caracteriza porque en su zona central existen varias bases del ADN que apenas muestran variaciones entre las diferentes unidades, este conjunto de bases centrales casi invariantes, se denomina "core". En el ejemplo tres repeticiones de una secuencia de doce bases (García y col. 2002).

----AACTGACGTAGA **AACTGACGTAGA** AACTGACGTAGA ---

**STR:** (Short Tandem Repeats o Repeticiones Cortas en Tandem), cuando la secuencia repetida sólo constan de 2 a 4 nucleótidos, generalmente siempre las mismas en cada unidad de repetición, conocidas como **ADN MICROSATÉLITES**, que son abundantes en el genoma y cerca de la mitad de los estudios hasta ahora son altamente polimórficos. Existen aprox. 600.000 loci microsatélites en el genoma siendo los más importantes aquellos cuya unidad de repetición consiste en 4 pares de bases llamados tetraméricos, cuyo número de loci diferentes en el genoma es de aprox. 200.000. En el ejemplo siete repeticiones de una secuencia de cuatro bases (Lorente y Lorente 1995) (García y col. 2002).

-----CCTG CCTG CCTG **CCTG CCTG** CCTG CCTG -----

En cualquiera de los dos tipos de polimorfismo, al estudiar un segmento determinado o LOCI o marcador genético por cada individuo, tendremos la presencia de trozos de ADN correspondientes al mismo marcador, debido a que la información genética se encuentra doblemente representada en las células somáticas (a excepción de las células sexuales). Es así como existe un ADN proveniente del set de cromosomas heredados del padre y otro ADN proveniente

de la madre. El análisis genético de un individuo puede realizarse estudiando un alto número de estos segmentos polimórficos de ADN, cuya probabilidad que por azar sea compartido con otro individuo no emparentado es casi nula (García y col. 2002).

#### **2.1.2.5. Marcadores Genéticos**

Los marcadores genéticos del ADN se basan en la gran variabilidad de la secuencia de nucleótidos del genoma humano; así, se cree que hay un sitio de heterocigocidad cada 500 pb. Las diferencias fenotípicas que se transmiten de padres a hijos residen en las variaciones permanentes en la secuencia de nucleótidos de ADN que se generan por mutaciones en las células de las líneas germinales, principalmente como resultado de los errores en su replicación, y que se fijan en el transcurso de miles de años de evolución (Bravo, 1999).

Los marcadores son factores importantes para el estudio de la estructura genética de una población donde se distribuyen y se heredan como un carácter mendeliano simple (Butter, 2001).

##### **2.1.2.5.1. SistemaHLA (Human Leucocyte Antigen)**

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) es una región genética ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 de los seres humanos que codifica para los llamados Antígenos HLA que fueron originariamente reconocidos por el papel que desempeñan al disparar la respuesta de células T que causa el rechazo del trasplante de tejidos (Abbas y col. 1998).

**Loci de clase II:** Hacia el centrómero a unas 400 kb de 210 HB, comienza la región que codifica para los productos HLA-DR, DQ y DP, con todos los genes localizados en un segmento de 1.000 kb. En primer lugar se halla el gen DR, le sigue hacia el centrómero la región DQ, que dista de los genes DR a una distancia variable de 80 – 240 Kb, según el haplotipo. En primer lugar se hallan

los genes DQA1 y DQB1, que codifican para las moléculas HLA-DQ, ambos genes describen un marcado polimorfismo (Laboratory Division, FBI. 1999).

La Clase II, la conforman los loci: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, cada uno compuesto por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente: Cadena  $\alpha$ , con un peso de 24-32 KD; y la Cadena  $\beta$  con un peso de 29-32 KD. Las porciones extracelulares de ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  se han dividido en dos segmentos de unos 90 aminoácidos cada uno, llamados  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Actualmente  $\alpha$  y  $\beta$  se denominan A y B respectivamente. La proteína HLA-DQ es un heterodímero compuesto por una cadena alfa (codificado por el locus HLA-DQ $\alpha$ ) y una cadena beta. Se expresa en los linfocitos B, macrófagos, epitelio del timo y células T activadas. La proteína HLA-DQ sirve como una proteína de membrana integral para acoplamientos, así como para presentar fragmentos antigénicos peptídicos a los receptores de células T de los linfocitos T CD4+. El polimorfismo que determina los alelos de locus HLA-DQA1 se detecta por amplificación de un fragmento de 242 pb (o 239 pb para los alelos 2 y 4) del segundo exón del gen del HLA-DQ $\alpha$  y posterior hibridación a una tira específica (Abbas y col. 1998).

Por este medio se han demostrado siete alelos por medio de la secuenciación de los productos de varias líneas celulares definidas serológicamente. Las sondas de oligonucleótidos han sido diseñadas para definir siete alelos más comunes (Walsh y col. 1991).

#### **2.1.2.5.2. Sistema PolyMarker**

Se descubre en la década de los '90. Junto con el sistema HLA, una reconocida casa comercial (Perkin Elmer Cetus) incluye el análisis de 5 loci adicionales para ser amplificados simultáneamente usando PCR. El sistema PolyMarker comprende los siguientes loci:

- LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor (Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad).
- GYPA: Glycophorin A (Glicoforina A).
- HBGG: Hemoglobin G Gammaglobin (Gammaglobulina G – Hemoglobina).
- D7S8.
- GC: Group Specific Component (Componente del Grupo Específico).

La localización cromosomal, cantidad del producto de ADN amplificado y el número de alelos distinguidos de los marcadores genéticos mencionados se detalla en el anexo N° 03 (PE Applied Biosystems, 1995).

#### **2.1.2.5.3. Otros sistemas: VNTRs y STRs**

El genoma de las células eucarióticas está lleno de secuencias repetitivas de ADN. Estas secuencias repetitivas se presentan en diferentes tamaños y están designadas típicamente por la longitud del núcleo de la unidad repetitiva y el número de unidades repetitivas continuas o la longitud total de la longitud de la región repetitiva. Largas unidades repetitivas pueden contener varios cientos de miles de bases en el núcleo repetido. A estas regiones se les conoce como satélite y pueden ser encontradas rodeando al centrómero: los minisatélites o VNTRs y los microsatélites o STRs (Butter, 2001).

## **2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

El auge de la Biología Molecular ha sido importante en el desarrollo de nuevas técnicas, siendo su máxima expresión la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es una técnica de amplificación genómica, para poder obtener millones de copias de un determinado segmento del genoma de un organismo. El proceso es rápido y extremadamente sensible (Ango, 1996).

En 1985, una ingeniosa técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) introdujo nuevas alternativas para la investigación científica y

para el diagnóstico clínico. Esta técnica fue desarrollada por un científico de la industria de la Biotecnología, el Dr. Karis Mullis, quien tubo la idea de realizar la duplicación del ADN *in vitro*. El Dr. Mullis pensó que usando dos oligonucleótidos iniciadores de orientación opuesta en conjunto con la enzima ADN Polimerasa permitiría generar *in vitro* un número ilimitado de copias de un fragmento de ADN de interés a amplificar. Es así que las primeras amplificaciones *in vitro* de ADN se realizaron en forma manual empleando tres baños termocontroladores y aplicando una enzima termosensible (Fragmento Klenow de la ADN Polimerasa aislada de *E. coli*). Sin embargo, este sistema necesitaba la adición de la enzima cada ciclo puesto que esta se inactivaba durante la etapa de denaturación del PCR. Desde 1983, muchos avances en la optimización del PCR se continúan realizando a fin de mejorar el sistema. Así, el primer avance importante fue el descubrimiento de las enzimas ADN Polimerasa termoestables aisladas de bacterias termófilas cuya actividad óptima se encuentra cercana a la temperatura de denaturación empleada durante la PCR. Inicialmente la enzima Taq ADN Polimerasa, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, fue la más usada. Otro gran avance fue el diseño e implantación de termocicladores automatizados que hacen a la técnica menos laboriosa (INS, 1998).

La PCR, es una técnica *in vitro* de amplificación enzimática del ADN, que permite obtener millones de copias de secuencias específicas (alelos) del genoma de un organismo, el proceso es bastante rápido, sencillo, específico y extremadamente sensible, sólo se necesitan muy pocas secuencias originales en la muestra por analizar para obtener un resultado positivo. En general el número de ciclos varía entre 25 y 35 y una molécula de ADN podrá ser amplificada de  $10^7$  a  $10^{11}$  veces. La temperatura de hibridación, tiempo de cada etapa, número de ciclos y condiciones de reacción son muy variables y han de adaptarse según



la naturaleza del ADN objetivo, cebadores, ADN Polimerasa, termociclador y otros (Lorente y Lorente, 1995).

En los últimos años, la PCR ha sido simplificado por la disponibilidad de los kits de reactivos que permiten a los laboratorios simplemente adherir al ADN un Master Mix de PCR pre-fabricado, el cual contiene todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación (Griffin y Griffin, 1994).

### **2.2.1. Etapas de la PCR**

#### **2.2.1.1. Desnaturalización**

Para iniciar la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla, esto se consigue aplicando temperaturas entre 90-95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Si el ADN sólo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión (Griffin y Griffin, 1994).

#### **2.2.1.2. Hibridación**

Denominado también fase de “annealing” o de emparejamiento, una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango entre 40-65 °C para producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes que se desea amplificar, la temperatura de fusión (“melting temperature”  $T_m$ ) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primers, cada primer exige una serie de estudios para determinar su  $T_m$  específico ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Griffin y Griffin, 1994).

### 2.2.1.3. Extensión

Durante este paso la *Taq* polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN desnaturalizada, la temperatura de este paso suele ser de 72 °C ya que es la temperatura en que la *Taq* Polimerasa alcanza su máxima actividad, normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2 Kb (Griffin y Griffin, 1994).

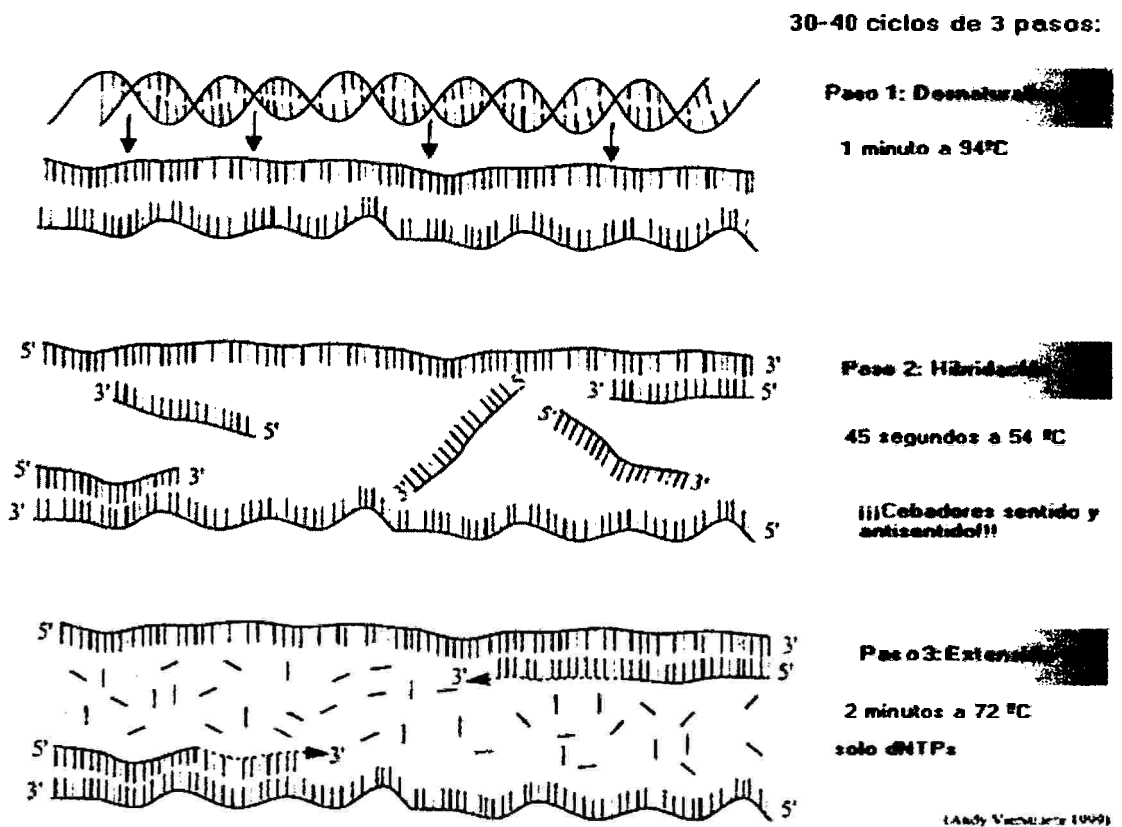


Figura: Pasos básicos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

### 2.2.2. Componentes de la PCR

a. **Buffer de Amplificación.**- ha de asegurar una fuerza iónica correcta y un pH adecuado para la reacción de la enzima, los componentes del buffer incluyen Tris-HCl, albúmina sérica, detergentes no iónicos como Tween 20 o Tritón X-100 (INS, 1998).

**b. Ión Magnesio ( $Mg^{+2}$ ).**- la concentración de ión  $Mg^{+2}$  libre es importante porque afecta la unión entre los oligonucleótidos iniciadores y el ADN molde asimismo la temperatura de anillamiento y la actividad enzimática se ve afectada, actúan como cofactores de la *Taq polimerasa* (INS, 1998).

**c. Primers.**- o cebadores, son secuencias entre 15 a 30 nucleótidos que se han de hibridar a cada extremo 3' y 5' de la secuencia de ADN a amplificar. La cantidad de cebadores puede variar, pero se utilizan generalmente entre 30 y 150 ng. Su exceso puede traducirse en amplificaciones no específicas o en la aparición de amplificación de dímeros de cebadores (INS, 1998).

**d. Desoxinucleótidos Trifosfatos.**- las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a  $200\mu M$  para cada uno de ellos, en un volumen de reacción de  $25\mu l$  con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre  $6-6.5\mu l$  de ADN. Las concentraciones de dNTPs y de  $MgCl_2$  van relacionadas ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasas* suficiente Mg como para incorporar dNTPs (INS, 1998).

**e. Taq Polimerasa.**- la actividad de esta enzima es influenciada por la concentración de dNTPs, Mg y algunos iones monovalentes, concentraciones elevadas de los mismos inhiben su actividad. La ADN polimerasa termoestable más utilizada es la *Taq polimerasa*, aislada de *Thermus aquaticus*, una bacteria termofílica que habita en las fuentes termales a temperaturas comprendidas entre  $70-85\text{ }^{\circ}C$ , a ésta temperatura es capaz de mantener una media de extensión de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C (INS, 1998).

**f. ADN molde o "Template".**- es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, es por tanto, el ADN que la *Taq polimerasa* utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas, la cantidad de ADN

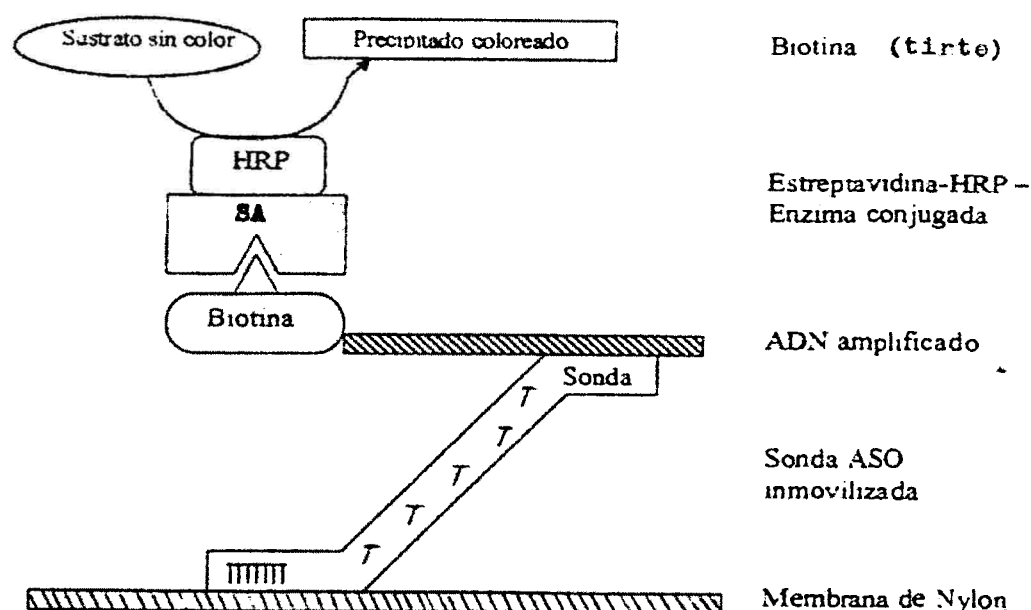
necesaria para la PCR depende de varios factores como: el segmento que se va a amplificar y la cantidad del ADN (INS, 1998).

### **2.3. TECNOLOGÍA FTA™**

A fines de la década de los '80, Lee Burgoyne en la Universidad Flinders en Australia desarrolló un papel al que llamaría FTA, como un método para almacenar ADN. El papel FTA™ es un papel absorbente basado en celulosa que contiene cuatro sustancias químicamente patentadas para proteger las moléculas de ADN de la degradación de la nucleasa, oxidación, daño ultravioleta y la preservación del papel del crecimiento microbiano y fúngico. Así, los ácidos nucleicos son físicamente atrapados, inmovilizados y estabilizados para su almacenaje a temperatura ambiente hasta por un período de 11 años. Estas tarjetas de papel FTA™ no sólo soportan muestras de sangre, sino también lo hacen de otros fluidos biológicos, plantas y bacterias. El uso del papel FTA™, envuelve la simple adición de una mancha de sangre al papel y el permitir que esta seque. Las células son lisadas y las proteínas denaturadas al contacto con el papel y el ADN de las células blancas de la sangre son inmovilizadas dentro de la matriz del papel. Un pequeño disco es removido de la tarjeta de FTA™ y colocado en un tubo para su lavado. El ADN ahora, puede ser purificado lavándolo con un solvente para remover grupos hemo y otros inhibidores de la PCR. Este solvente es un Buffer de Purificación, conocido como solución de lavado, el cual también ha sido patentado por la casa comercial Whatman™. La purificación del disco de papel es observable ya que al lavarse el disco, el color rojo es removido con el sobrenadante. El disco lavado, es luego introducido directamente a la PCR. Una ventaja adicional del papel FTA™ es que resultados consistentes pueden ser obtenidos sin cuantificación (Whatman, BIOScience 1999).

## 2.4. TIPADO MEDIANTE DOT BLOT: SONDAS DE HIBRIDACIÓN

En 1987, con la introducción de la PCR se desarrollaron métodos para el análisis de ADN de los genes del sistema HLA y PM. La primera estrategia de análisis tras la amplificación con PCR fue detectar polimorfismos de secuencia usando oligonucleótidos específicos de alelos (Allele-Specific Olinonucleotide ASO) en forma de Dot Blot. Las sondas tipo ASO se unen a secuencias de ADN que contienen su exacta secuencia complementaria, por ello para cada alelo a determinar en un locus hace falta una sonda complementaria. En la práctica, una batería de sondas ASO se fijan a una membrana de nylon en forma de tira, una tira puede albergar sondas de diferentes alelos de varios loci, las regiones de ADN una vez amplificadas se unen a sus sondas complementarias. Para facilitar la lectura una molécula marcada se une al extremo 5' del primer de amplificación de tal modo que cuando el ADN amplificado está unido a la sonda, se puede visualizar. Las sondas ASO se fijan a una membrana de nylon en forma de tira. Al hibridarse los alelos a la sonda alelo-específica se visualizarán a manera de puntos azules la presencia de dichos alelos (Laboratory Division, FBI 1999).



Generación de Dot Blot utilizando Sondas Inmovilizadas - ASO

Fuente: Amplitype PM+DQA1 Amplification and Typing Kits, manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures, Perkin Elmer

## **2.5. FRECUENCIAS GENÉTICAS**

Es una caracterización de los alelos presentes en un locus genético y se refiere a la proporción en que se encuentran los diferentes alelos dentro de la población. Dicho de otras palabras, la frecuencia genética es la probabilidad de presencia de un alelo en una población. La distribución de las frecuencias de varios fenotipos constituye la descripción esencial de una población. Incluso a manera de ejemplo, se puede citar que la evolución en la forma más sencilla se describe por los cambios en las frecuencias de los genes (Dubinin, 1981).

### **2.5.1. Variación Poblacional**

La gran mayoría de nuestro ADN (más del 99.7%) es el mismo entre las personas. Es una pequeña fracción de ADN (0.3% aproximadamente un millón de nucleótidos) que difiere entre las personas y nos hace únicos como individuos. Estas regiones variables proveen la capacidad de usar la información de ADN para propósitos de identidad humana. En la tipificación de ADN múltiples marcadores o loci son examinados, a más marcadores examinados y comparados, mayor oportunidad a que dos individuos no relacionados tengan diferentes genotipos. La variabilidad que se observa en estas locaciones es usada para incluir o excluir muestras (Rothhammer, 1977).

### **2.5.2. Tipificación Poblacional**

Las pruebas de tipificación poblacional, son métodos de determinación de alelos específicos presentes en una muestra biológica, esto da como resultado el incluir o excluir la muestra procedente de un mismo origen. Entonces, el contar con un patrón de frecuencias alélicas se hace necesario para usarlo como herramienta en estudios comparativos de estructuras genéticas y en trabajos de identificación humana (Rothhammer, 1977).

## 2.6. GENES EN POBLACIONES

La genética de poblaciones, que investiga cómo se expanden los genes a través de las poblaciones de organismos, encontró una base sólida en los trabajos del matemático inglés Godfrey H. Hardy y el obstetra alemán Wilhelm Weinberg, quienes formularon lo que ahora se conoce como la ley de Hardy - Weinberg. Esta afirma que si dos alelos de un gen autosómico (A y a) existen en una población, si la frecuencia con las que se presentan (expresadas en decimales) son  $p$  y  $q$  ( $p + q = 1$ ) respectivamente, y si el apareamiento se produce de forma aleatoria con respecto al gen, entonces, después de una generación la frecuencia de los tres genotipos AA, Aa y aa será  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , respectivamente. Por consiguiente en ausencia de alteraciones estas secuencias permanecerán constantes de generación en generación. Cualquier variación de la frecuencia, que indica un cambio evolutivo, debe estar por tanto relacionado con alteraciones, estas pueden ser mutaciones, selección natural, migración y reproducción en pequeñas poblaciones que pueden perder alelos determinados por casualidad o desviación genética al azar (Rothhammer, 1977).

## 2.7. CÁLCULOS DE INTERÉS PARA EL ESTUDIO POBLACIONAL

### 2.7.1. Equilibrio de Hardy–Weinberg

La ley de equilibrio de Hardy – Weinberg dice en una población panmíxica (cruzamiento de individuos en una población, al azar), sin migración o selección contra un genotipo y cuya tasa de mutación es despreciable, las proporciones de los diferentes genotipos serán constantes de generación en generación.

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

$p$  = se define como la frecuencia del alelo dominante, y

q = como la frecuencia del alelo recesivo. Para un rasgo controlado por un par de alelos (A y a); es decir p es igual a todos los alelos por la mitad los individuos que son dominantes homocigotos (AA) y los alelos en la población que es heterocigoto (Aa) para este rasgo (Rothhammer, 1977).

### 2.7.2. Prueba de Chi Cuadrado ( $X^2$ )

La comparación entre los fenotipos reales y los esperados, si la población se encontrase en equilibrio, se lleva a cabo mediante el test de  $X^2$  de comparación de hipótesis, dada por la siguiente expresión:

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Siendo:

O = Fenotipos observados

E = Fenotipos esperados

Si el valor de  $X^2$  calculado es menor que el tabulado de  $X^2$  para un nivel de significación, se dice que las frecuencias fenotípicas observadas se ajustan a las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg (Rothhammer, 1977).

### 2.7.3. Poder de Discriminación (PD)

Viene a ser la capacidad que el laboratorio tiene en un momento determinado para analizar un vestigio y diferenciarlo de otro tomado al azar, el cual depende de los loci analizado y del polimorfismo de cada uno. El valor matemático corresponde al resultante de restar a la unidad la sumatoria de los cuadrados de la frecuencia de cada genotipo, y se calcula para un locus mediante la fórmula (Weir, 1996)(Carracedo y Barros, 1996).

$$PD = 1 - \sum P_j^2$$

$\sum P_j^2$  = Sumatoria de la frecuencia de cada genotipo.



#### 2.7.4. Probabilidad de Coincidencia (PC)

Es el concepto contrario al del poder de discriminación y se define como la probabilidad que un vestigio analizado coincida plenamente con otro tomado al azar, matemáticamente la probabilidad de coincidencia, es el complementario de uno del PD y se calcula (Weir, 1996)(Carracedo y Barros, 1996).

$$PC = 1 - PD$$

#### 2.7.5. Probabilidad de Exclusión a Priori (PE)

La PE de un marcador genético en una población determinada, es el valor porcentual que está en función directa del polimorfismo de un sistema, es decir cuanto más polimórfico sea un sistema y más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, mayor será su probabilidad a priori de exclusión. La PE depende del número de alelos identificados y de la distribución de las frecuencias alélicas (Weir, 1996)(Carracedo y Barros, 1996).

$$PE = \sum P_i (1 - p_i)^2 (1 - p_i + p_i^2) + \sum \sum p_i p_j (p_i + p_j) (1 - p_i - p_j)^2$$

Siendo:

n = Número de alelos

P<sub>i</sub> = Frecuencias genéticas respectivas.

$$PE_{acum.} = 1 - (1 - P_1) (1 - P_2) \dots \dots \dots (1 - P_n)$$

Siendo: P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, ... P<sub>n</sub>, Probabilidades de exclusión individuales de cada sistema.

### 2.8. BANCO DE DATOS GENÉTICOS

Al comenzar el proceso de examen de ADN tenemos el material genético en las muestras sometidas al análisis, al finalizar tenemos la información genética que puede ser almacenada en cualquier soporte físico capaz de acumular información, así la información genética puede guardarse en papeles, carpetas,

archivos, soportes electrónicos, discos duros, flexibles o cintas. La expresión Banco de Datos Genéticos (BDG) si bien parece referirse exclusivamente a los sistemas de acopio de información, en la literatura aparece de manera ambigua, especialmente porque en muchos bancos de información se guarda paralelamente la muestra, lo que los transforman en definitiva en bancos que manejan material genético o información genética, se trata sin embargo de situaciones distintas que pueden y deberían funcionar de manera diferente. Se entiende como BDG a un conjunto organizado y sistematizado de información genética referido a individuos de la especie humana y obtenidos a partir del análisis de ADN, que en términos generales implica los procesos a la totalidad de una población o a un sector de ella, aún cuando se ha planteado la posibilidad de extender el fichaje por ADN a todos los recién nacidos en algunos países, los bancos existentes se refieren preferentemente a grupos limitados de individuos (García y col. 2002).

La finalidad de estos bancos puede ser muy variada, pero las más frecuentes están relacionadas con la investigación científica y la identificación de personas o restos humanos, y cualquiera que sea su finalidad, los objetivos de la incorporación de información adicional son:

- Personas con actividades riesgosas: se busca la información necesaria para tratamientos médicos de urgencia, así como para identificar cadáveres o restos humanos, y
- Personas con conflicto jurídico; éstos bancos cubre dos grandes necesidades: Identificación de paternidad e identificación de delincuentes (García y col. 2002).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos Generales de la Zona de Estudio**

##### **3.1.1. Ubicación de la zona de estudio**

La ciudad de Ayacucho se encuentra ubicada en el extremo noroccidental del departamento de Ayacucho y al sur de la sierra central del país, en el área meridional de los Andes, a 2.746 msnm; y está comprendido entre los 13°09'37" latitud Sur y 74°13'33" longitud Oeste. La ciudad ocupa el distrito de Ayacucho (cercado o también conocido como centro histórico), así como el área urbana de los distritos de Carmen Alto, San Juan Bautista y Jesús Nazareno (Garayar, 2003).

##### **3.1.2. Clima**

Ayacucho está ubicada climatológicamente según la altura en la zona quechua de acuerdo a la clasificación hecha por el estudioso Javier Pulgar Vidal, que dividió el territorio del Perú en ocho regiones naturales. Esta zona se caracteriza por tener quebradas amplias con fondos planos. El clima es templado y seco, con una temperatura promedio de 17.5 °C y una humedad relativa promedio de 56% (Garayar, 2003).

### **3.1.3. Características Socio-demográficos**

Según el XI Censo de población y VI de Vivienda efectuado por el Instituto Nacional de Estadística e Informática el 2007, la ciudad de Ayacucho cuenta con una población de 151.019 y su tasa de crecimiento anual es de 2.5% (INEI, 2008).

## **3.2. Tipo de Estudio**

### **3.2.1. Población**

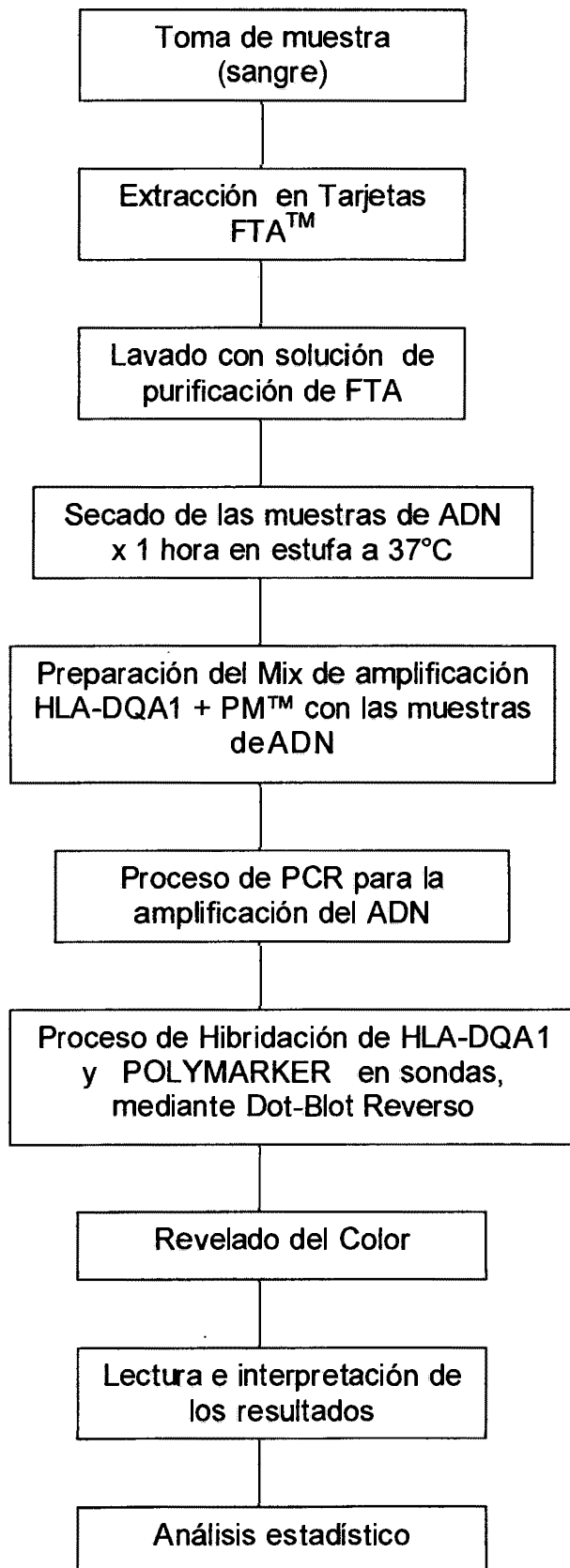
La población estuvo constituida por los habitantes de la ciudad de Ayacucho.

### **3.2.2. Muestra**

La muestra estuvo conformada por 50 personas escogidas al azar (los científicos de los sistemas Roche Molecular tipificaron 200 muestras de hispanicos, los datos actualmente disponibles de la población sugieren que no existan desviaciones significativas de las expectativas Hardy-Weinberg del equilibrio para estos seis marcadores). A las personas escogidas se les informó del estudio que se realizó, para lo cual llenaron fichas de consentimiento en donde se les informó el propósito de la investigación y el tipo de muestra que se obtuvo (ver ANEXO N° 01).

## **3.3. Procedimiento**

Para entender mejor el procedimiento y el tratamiento que se dio a las muestras dentro del laboratorio, primero realizamos un esquema de trabajo seguidamente desarrollamos los pasos a seguir:



### **3.3.1. Obtención de la muestra biológica.**

Se extrajo sangre por punción dactilar con una lanceta estéril, las cuáles fueron impregnadas en tarjetas FTA™ y se dejó secar al medio ambiente, éstas se rotularon, almacenándolas luego individualmente en sobres de papel codificados para luego ser usados en laboratorio.

### **3.3.2. Procesamiento de la muestra.**

Cuando las células de la sangre son lisadas al manchar sobre el papel de FTA™, el ADN nuclear de las células blancas de la sangre se inmovilizan dentro de la matriz del papel.

Ya con la muestra de sangre seca en la tarjeta y en el laboratorio, se obtuvieron con sacabocados 3 discos de 2mm de diámetro de cada muestra y se colocaron en 50 tubos de 1.5ml. Estos discos fueron lavados con Buffer de lavado (reactivo de purificación) para FTA™, el cual remueve los grupos hemo y otros inhibidores de PCR. Se agregó 200ul de reactivo FTA a cada tubo, se agitó suavemente y luego de 3 a 5 minutos se eliminó el sobrenadante, quedando los discos en el tubo. Se realizó esta operación por 3 a 4 veces o hasta que los discos se observen de color blanco. Es aquí en donde se obtiene la purificación del disco. Este método de extracción y purificación de FTA™ no requieren cuantificación ya que está diseñada para un volumen de reacción de PCR entre 5 – 25ul (Whatman, BIOScience. 1999).

### **3.3.3. Amplificación y Tipificación de ADN utilizando el Kit PCR**

#### ***AmpliType*® PM + DQA1**

#### **Amplificación del HLA-DQA1 y PolyMarker**

El kit de amplificación y tipificación PCR *AmpliType*® PM + DQA1, contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación y tipificación del

locus HLA-DQA1 y de los cinco loci PolyMarker, presentes en las muestras biológicas en una única alícuota de ADN, estos reactivos amplifican directa y simultáneamente una región en el gen HLA-DQA1 y de los loci: LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y GC. Para la amplificación la mezcla de reacción se llevó a cabo en los siguientes volúmenes (Walsh, 1991)(PE Applied Biosystems, 1995).

- 30ul de PCR *AmpliType*® PM + DQA1 Mix de reacción.
- 30ul *AmpliType*® PM + DQA1 de Primers.
- Un disco o punch de matriz de FTA™ extraído y purificado.
- Para el control positivo se añadió 24ul del mix de reacción, 24ul de Primers y 12ul de 100ng/ml del control de ADN.

Las condiciones de reacción utilizando el termociclador fueron los siguientes:

CONDICIONES	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Pre-Hold		95°C	10 min
Denaturación	32 Ciclos	95°C	30 seg
Hibridación		63°C	30seg
Extensión		72°C	30 seg
Post-Hold		72°C	10 min

\* Programa de Amplificación para PM + DQA1

Una vez finalizado el proceso de amplificación de las muestras, se retiraron del termociclador y fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta el procesado de la hibridación en sonda.

### **Hibridación del ADN Amplificado:**

El proceso de hibridación se basa en la técnica del Dot-Blot en donde una porción del producto amplificado se hibrida a una membrana de nylon con sondas de ADN fijadas a la misma, complementarias a los marcadores en estudio.

El proceso se divide en tres etapas:

- a. La hibridación del ADN amplificado a la sonda de ADN.
- b. La unión de la enzima conjugada – peroxidasa de rábano (HRP-SA) a los productos de PCR ya hibridados.
- c. Eliminación de los productos de PCR unidos no específicamente.

Se sigue el protocolo de hibridación de ADN PM + DQA1 modificado, este proceso está dado por fases secuenciales que se dan a continuación.

1. Las tiras de sonda de ADN de PM y DQA1™, se colocaron en la bandeja de tipificación y se añadieron 3ml de la solución de hibridación precalentada a 55°C, a cada bandeja de tipificación.
2. Se denaturalizó el ADN amplificado, a 95°C durante 5 minutos, colocándolo en el termociclador.
3. Inclinando la bandeja de tipificación seguidamente se añadió 45ul de ADN amplificado por debajo de la superficie de la solución de hibridación en cada cavidad. Se cerró la bandeja y homogenizó.
4. Se incubó a 55°C durante 15 minutos para hibridar el ADN amplificado a las tiras de sonda de ADN, transcurrido el tiempo se desechó el contenido de cada cavidad.
5. Se añadió 5ml de solución de lavado precalentada, se homogenizó y eliminó la solución.
6. Se añadió la **Solución de Conjugado Enzimático** (3.3ml de solución de hibridación precalentada y 27ul del conjugado de la enzima rábano HRP-SA



por cada tira) en cada cavidad y se incubó en baño maría a 55°C durante 5 minutos. Se eliminó el contenido de cada cavidad y se realizó lavados con solución de lavado.

7. Para el lavado riguroso se añadió 5ml de solución de lavado e incubó a 55°C durante 15 minutos, se eliminó el contenido (PE Applied Biosystems, 1995).

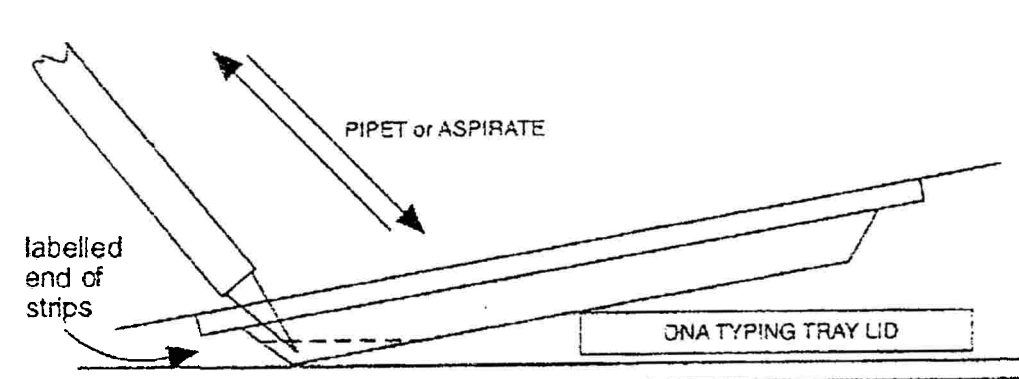


Figura: Manejo de soluciones en la bandeja de tipificación de ADN.

Fuente: Manual de PE–Applied Biosystems para PM+DQA1 – PCR

### Proceso de Revelado de Color

8. Se agregó 5ml de la solución Buffer Citrato en cada cavidad, la cual se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos; se eliminó y se añadió la **Solución de Revelado de Color** (por cada tira 5ml de Buffer Citrato, 0.5ul de peróxido de hidrógeno al 30% y 0.25ml de solución **TMB cromógeno**).
9. Se incubó a temperatura ambiente, en campo oscuro durante 20 minutos.
10. Finalmente se añadió abundante agua desionizada estéril (PE Applied Biosystems, 1995).

### Lectura e Interpretación de Resultados

Los resultados se interpretaron leyendo el patrón de puntos de color en las tiras de sonda mediante la presencia o ausencia de puntos de color azul, se

inició examinando los controles internos asignados como puntos "C" y "S" en HLA-DQA1 y PM respectivamente.

En HLA-DQA1 se pueden detectar siete alelos y hasta 28 genotipos, pudiéndose encontrar las siguientes variantes:

LOCUS	SONDA	Alelos DQA1 detectados
HLA DQA1	1	1.1, 1.2, 1.3
	2	2
	3	3
	4	4.1, 4.2/4.3

\* FUENTE: AmpliType PM + DQA1 PCR Amplification and Typing Kits, Manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures, Perkin Elmer (PE Applied Biosystems. 1995).

Y en PolyMarker se pueden detectar un total de 12 alelos diferenciados para los cinco loci, resultando en 972 combinaciones genotípicas diferentes, pudiendo encontrar los siguientes genotipos:

LOCI	Alelos PM detectados	GENOTIPOS
LDLR	A, B	AA, AB, BB
GYPA	A, B	AA, AB, BB
HBGG	A, B, C	AA, AB, AC, BB, BC, CC
D7S8	A, B	AA, AB, BB
GC	A, B, C	AA, AB, AC, BB, BC, CC

\* FUENTE: AmpliType PM + DQA1 PCR Amplification and Typing Kits, Manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures, Perkin Elmer (PE Applied Biosystems. 1995).

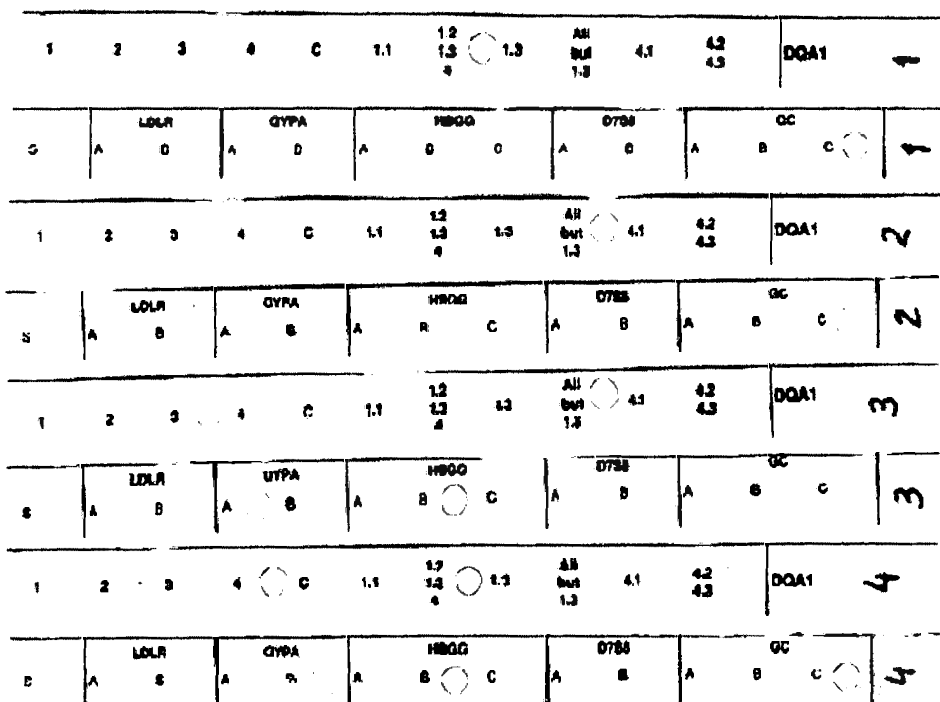
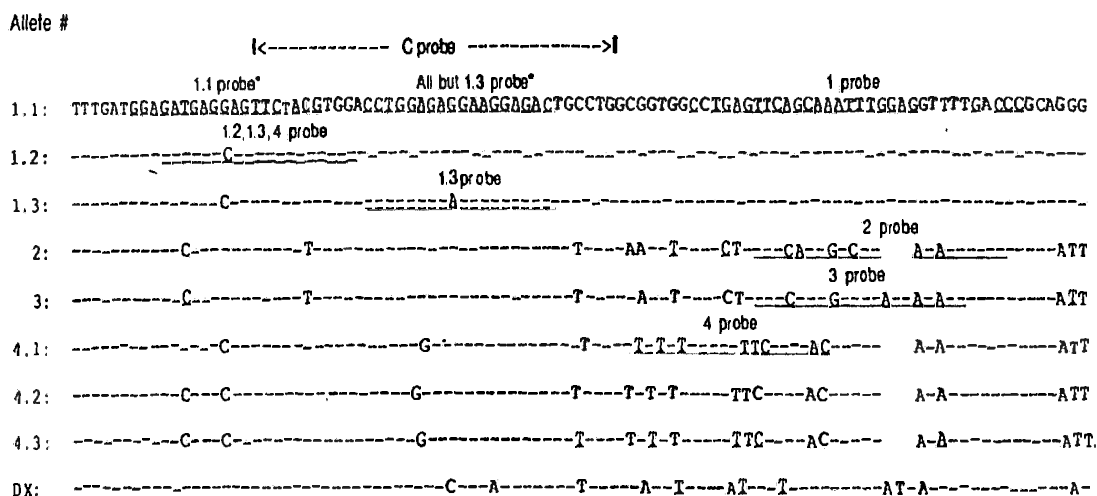


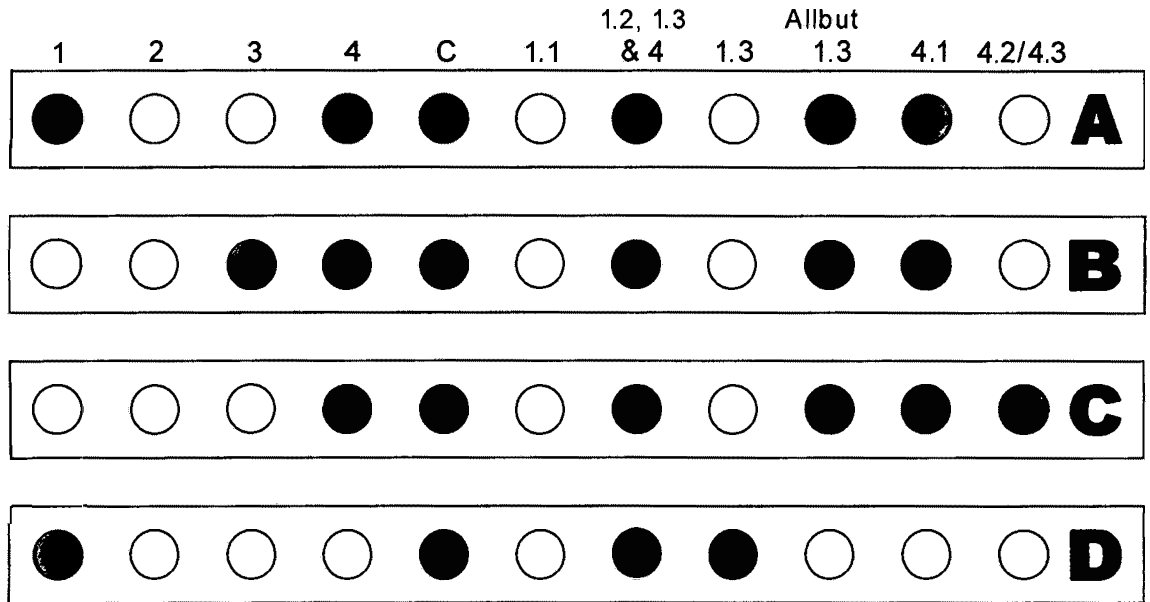
Figura: Hibridación de HLA – DQA1 y PolyMarker de las 4 primeras muestras, en las sondas mediante Dot Blot reverso.

Para entender la interpretación de la presencia de determinados alelos pondremos unos ejemplos del sistema HLA – DQA1:



Esquema que muestra el Polimorfismo Sustitucional de uno o dos pb en un Segmento de 98 Nucleótidos del Exón 2 del Gen HLA – DQα

Fuente: Manual AmpliType user Guide 55737-1/91-03 Perkin Elmer



Para la muestra A: presenta los alelos 1.2 y 4.1

Para la muestra B: presenta los alelos 3 y 4.1

Para la muestra C: presenta los alelos 4.1 y 4.2/4.3

Para la muestra D: presenta los alelos 1.2 y 1.3

### 3.4. Análisis Estadístico

Para los análisis estadísticos se hizo uso del programa bioestadística GDA, para la determinación de las expectativas de Hardy - Weinberg. Los datos fueron analizados por el software PowerStats. Cuando la información apropiada para calcular frecuencias génicas está disponible, es interesante probar la validez del equilibrio de Hardy – Weinberg. Se puede computarizar las frecuencias genéticas de los datos y luego de estas las frecuencias esperadas de varios fenotipos. Estas frecuencias esperadas son comparadas con las observadas considerando el tamaño de la muestra. La prueba de Chi cuadrado se calculó manualmente para comparar los datos obtenidos en nuestra población en estudio con otras poblaciones pertinentes. Todas las pruebas estadísticas se trabajaron a un nivel de significación de  $\alpha = 0.05$  (Perez, 2002).

#### **IV. RESULTADOS**

**CUADRO N° 03:** Frecuencia genotípica del locus HLA-DQA1 en 50 pobladores del distrito de Ayacucho, 2003

<b>Pares de Alelos</b>	<b>N° de genotipos</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>%</b>
1.1, 1.1	0	0	0
1.1, 1.2	0	0	0
1.1, 1.3	0	0	0
1.1, 2	0	0	0
1.1, 3	4	0.08	8
1.1, 4.1	1	0.02	2
1.1, 4.2/4.3	1	0.02	2
1.2, 1.2	1	0.02	2
1.2, 1.3	1	0.02	2
1.2, 2	0	0	0
1.2, 3	3	0.06	6
1.2, 4.1	2	0.04	4
1.2, 4.2/4.3	1	0.02	2
1.3, 1.3	0	0	0
1.3, 2	0	0	0
1.3, 3	0	0	0
1.3, 4.1	0	0	0
1.3, 4.2/4.3	0	0	0
2, 2	0	0	0
2, 3	1	0.02	2
2, 4.1	1	0.02	2
2, 4.2/4.3	1	0.02	2
3, 3	12	0.24	24
3, 4.1	10	0.20	20
3, 4.2/4.3	2	0.04	4
4.1, 4.1	4	0.08	8
4.1, 4.2/4.3	4	0.08	8
4.2/4.3, 4.2/4.3	1	0.02	2

**CUADRO N° 04:** Frecuencia genotípica de los loci PolyMarker en 50 pobladores del distrito de Ayacucho, 2003

<b>Marcadores genéticos</b>	<b>Pares de alelos</b>	<b>N° de genotipos</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>%</b>	<b>% Total</b>
LDLR	AA	21	0.42	42	100
	AB	21	0.42	42	
	BB	08	0.16	16	
GYPA	AA	20	0.40	40	100
	AB	27	0.54	54	
	BB	03	0.06	6	
HBGG	AA	03	0.06	6	100
	AB	22	0.44	44	
	AC	01	0.02	2	
	BB	23	0.46	46	
	BC	01	0.02	2	
	CC	00	0.00	0	
D7S8	AA	17	0.34	34	100
	AB	23	0.46	46	
	BB	10	0.20	20	
GC	AA	01	0.02	2	100
	AB	02	0.04	4	
	AC	10	0.20	20	
	BB	07	0.14	14	
	BC	13	0.26	26	
	CC	17	0.34	34	

**CUADRO N° 05:** Poder de Discriminación (PD), Probabilidad de Coincidencia (PC) y Probabilidad de Exclusión (PE) de los seis loci estudiados en 50 pobladores del distrito de Ayacucho, 2003

<b>Marcadores genéticos</b>	<b>Poder de Discriminación</b>	<b>Probabilidad de Coincidencia</b>	<b>Probabilidad de Exclusión</b>
HLA-DQA1	0.8728	0.1272	0.3417
LDLR	0.6216	0.3784	0.1266
GYPA	0.5448	0.4552	0.2250
HBGG	0.5904	0.4096	0.1706
D7S8	0.6328	0.3672	0.1548
GC	0.7552	0.2448	0.1875



**CUADRO N° 06:** Genotipos homocigotos y heterocigotos en los seis loci, en 50 pobladores del distrito de Ayacucho, 2003

<b>Marcadores genéticos</b>	<b>Homocigosis</b>	<b>%</b>	<b>Heterocigosis</b>	<b>%</b>	<b>% Total</b>
HLA-DQA1	18	36	32	64	100
LDLR	29	58	21	42	100
GYPA	23	46	27	54	100
HBGG	26	52	24	48	100
D7S8	27	54	23	46	100
GC	25	50	25	50	100

**CUADRO N° 07: Test del Equilibrio de Hardy-Weinberg para los seis loci estudiados en 50 pobladores del distrito de Ayacucho, 2003**

<b>Locus</b>	<b>Homocigosis Observada</b>	<b>Homocigosis Esperada</b>	<b>Heterocigosis Observada</b>	<b>Heterocigosis Esperada</b>	<b>Test X<sup>2</sup>c</b>
HLA	0.36	0.278788	0.64	0.721212	3.28
LDLR	0.58	0.529091	0.42	0.470909	1.04
GYPA	0.46	0.553333	0.54	0.446667	3.52
HBGG	0.52	0.556162	0.48	0.443838	0.53
D7S8	0.54	0.504848	0.46	0.495152	0.49
GC	0.50	0.422828	0.50	0.577172	2.44
Media	0.493333	0.474175	0.506667	0.525825	---

Para 7 alelos (HLA-DQA1)  $X^2_t = 12.59$  g.l. = 6  $p < 0.05$

Para 2 alelos (LDLR, GYPA, D7S8)  $X^2_t = 3.85$  g.l. = 1  $p < 0.05$

Para 3 alelos (HBGG, GC)  $X^2_t = 5.99$  g.l. = 2  $p < 0.05$

**CUADRO N° 08:** Test de correlación de Karlin entre los seis marcadores moleculares estudiados en 50 pobladores del distrito de Ayacucho, 2003

<b>Número</b>	<b>Correlación de Locus</b>	<b>Valor encontrado</b>
1	HLA-DQA1/LDLR	0.241000
1	HLA-DQA1/GYPA	0.433000
1	HLA-DQA1/HBGG	0.326500
1	HLA-DQA1/D7S8	0.216000
1	HLA-DQA1/GC	0.169500
2	LDLR/GYPA	0.670000
2	LDLR/HBGG	0.081000
2	LDLR/D7S8	0.989000
2	LDLR/GC	0.521500
3	GYPA/HBGG	0.087000
3	GYPA/D7S8	0.218000
3	GYPA/GC	0.482000
4	HBGG/D7S8	0.685500
4	HBGG/GC	0.768000
5	D7S8/GC	0.435000

**CUADRO N° 09:** Comparación de la frecuencia del locus HLA-DQA1 de los pobladores del distrito de Ayacucho con el total de las otras ciudades estudiadas en el Perú, 2003

<b>Marcador genético</b>	<b>Alelos detectados</b>	<b>Ayacucho</b>	<b>Perú</b>
HLA-DQA1	1.1	0.060	0.045
	1.2	0.090	0.055
	1.3	0.010	0.030
	2	0.030	0.050
	3	0.440	0.425
	4.1	0.260	0.235
	4.2/4.3	0.110	0.160

$\chi^2_c = 13.48$

$\chi^2_t = 12.59$

g.l. = 6

$p < 0.05$

\* FUENTE: Pérez, L. 2002. Genética Poblacional de 19 loci en seis ciudades del Perú. Tesis. Escuela de Post-Grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.

**CUADRO N° 10:** Comparación de la frecuencia de los loci PolyMarker de los pobladores del distrito de Ayacucho con el total de otras ciudades estudiadas en el Perú, 2003

Marcadores genéticos	Alelos detectados	Ayacucho	Perú	X <sup>2</sup> c
LDLR	A	0.630	0.585	1.67
	B	0.370	0.415	N.S.
GYPA	A	0.670	0.690	0.37
	B	0.330	0.310	N.S.
HBGG	A	0.290	0.270	0.80
	B	0.690	0.715	
	C	0.020	0.015	
D7S8	A	0.570	0.605	1.02
	B	0.430	0.395	N.S.
GC	A	0.140	0.180	3.06
	B	0.290	0.250	
	C	0.570	0.570	

N.S. = No Significativo

Para 2 alelos      X<sup>2</sup>t = 3.85      g.l. = 1      p<0.05

Para 3 alelos      X<sup>2</sup>t = 5.99      g.l. = 2      p<0.05

\*FUENTE: Pérez, L. 2002. Genética Poblacional de 19 loci en seis ciudades del Perú. Tesis. Escuela de Post-Grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.

**CUADRO N° 11:** Comparación de la frecuencia del locus HLA-DQA1 de los pobladores del distrito de Ayacucho con el de las poblaciones hispanoamericanas, 2003

<b>Marcador genético</b>	<b>Alelos detectados</b>	<b>Ayacucho</b>	<b>Hispano-Americano</b>
HLA-DQA1	1.1	0.060	0.105
	1.2	0.090	0.130
	1.3	0.010	0.053
	2	0.030	0.115
	3	0.440	0.218
	4.1	0.260	0.269
	4.2/4.3	0.110	0.110

$X^2_c = 71.14$

$X^2_t = 12.59$

g.l. = 6

$p < 0.05$

\*FUENTE: PE Applied Biosystems. 1995. AmpliType PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kits. Manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures. Applied Biosystems Division. New Jersey. USA

**CUADRO N° 12:** Comparación de la frecuencia de los loci PolyMarker de los pobladores del distrito de Ayacucho con el de las otras poblaciones hispanoamericanas, 2003

<b>Marcadores genéticos</b>	<b>Alelos detectados</b>	<b>Ayacucho</b>	<b>Hispano-Americano</b>	<b>X<sup>2</sup>c</b>
LDLR	A	0.630	0.485	16.84
	B	0.370	0.515	
GYPA	A	0.670	0.615	2.56
	B	0.330	0.385	N.S.
HBGG	A	0.290	0.375	10.80
	B	0.690	0.580	
	C	0.020	0.045	
D7S8	A	0.570	0.622	2.30
	B	0.430	0.378	N.S.
GC	A	0.140	0.203	10.17
	B	0.290	0.335	
	C	0.570	0.462	

N.S. = No Significativo

Para 2 alelos            X<sup>2</sup>t = 3.85                    g.l. = 1            p<0.05

Para 3 alelos            X<sup>2</sup>t = 5.99                    g.l. = 2            p<0.05

\*FUENTE: PE Applied Biosystems. 1995. AmpliType PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kits. Manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures. Applied Biosystems Division. New Jersey. USA

## V. DISCUSIÓN

La extracción y purificación de ADN se realizó utilizando tarjetas de papel FTA™, método que demuestra ser rápido, práctico, no tóxico y no requiere de cuantificación. Además el manejo adecuado de esta metodología permite asegurar un trabajo libre de contaminantes externos, ya que las tarjetas poseen antibacterianos, antimicóticos y otras sustancias que preservan la muestra tomada y puesto que los marcadores a usarse son secuencias humanas con condiciones ya establecidas y fielmente seguidas, sólo reconocerán ADN humano.

Se realizó la comparación de frecuencias genéticas con las frecuencias de la población peruana y frecuencias hispanoamericanas, debido a que son referencias evaluables por la ubicación geográfica y porque existe menor diferencia con las estudiadas.

En el cuadro N° 01, el marcador **Antígeno Leucocitario Humano DQα-A1 (HLA-DQA1)**, el alelo denominado **(3)** fue de mayor frecuencia encontrado en la población del distrito de Ayacucho con 0.44, y el de menor frecuencia encontrada fue el alelo denominado **(1.3)** con 0.01. Estos resultados coinciden



con los obtenidos por Pérez, 2002; quien encuentra mayor frecuencia en la población peruana el alelo denominado (3) con 0.425 y el de menor frecuencia el alelo denominado (1.3) con 0.03. Realizando comparaciones mediante la prueba de Chi cuadrado se encontraron diferencias significativas como se observa en el cuadro N° 09. En poblaciones hispanoamericanas la mayor frecuencia fue encontrada en el alelo denominado (4.1) con 0.269 seguido del alelo denominado (3) con 0.218, en caso del alelo de menor frecuencia es el denominado (1.3) con 0.053, el cual realizando comparaciones en la prueba de Chi cuadrado con nuestra población, se encuentra una diferencia significativa, como se presenta en el cuadro N° 11.

En el cuadro N° 02, el marcador **Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDLR)**, el alelo de mayor frecuencia encontrado en la población ayacuchana fue el denominado (A) con 0.63 coincidiendo con los de la población peruana según Pérez, 2002; que también encuentra mayor frecuencia en el alelo denominado (A) con 0.585, pero no coincide con la población hispanoamericana que encuentra mayor frecuencia en el alelo denominado (B) con 0.515; el alelo de menor frecuencia encontrada en nuestra población fue el denominado (B) con 0.37, en la población peruana el alelo denominado (B) está presente con 0.415, pero para la población hispanoamericana se encuentra el alelo denominado (A) con 0.485. Realizando las comparaciones mediante la prueba de Chi cuadrado, encontramos que entre la población ayacuchana y la población peruana no existe diferencia significativa, mostrado en el cuadro N° 10. Para la comparación de nuestra población y poblaciones hispanoamericanas si se encuentra diferencia significativa, mostrado en el cuadro N° 12.

En el marcador **Glicoforina A (GYPA)**, el alelo de mayor frecuencia encontrado en la población ayacuchana es igual que la peruana y la población hispanoamericana, siendo este el denominado (A) con 0.67, 0.69 y 0.615

respectivamente, así mismo el alelo de menor frecuencia encontrado en las tres poblaciones es el alelo denominado **(B)** con 0.33, 0.31 y 0.385 respectivamente. La comparación mediante la prueba de Chi cuadrado entre la población ayacuchana y la peruana no presenta diferencia significativa, como se muestra en el cuadro N° 10; igualmente la comparación con la población hispanoamericana y la nuestra no presentan diferencia significativa, mostrada en el cuadro N° 12.

En el marcador **Hemoglobina G Gammaglobulina (HBGG)**, el alelo que se presentó con mayor frecuencia en la población ayacuchana fue el denominado **(B)** con 0.69, al igual que en la población peruana e hispanoamericana, con 0.715 y 0.580, respectivamente. Y el alelo de menor frecuencia fue el denominado **(C)** que en la población ayacuchana se encontró con 0.02, en la población peruana 0.015 y en la hispanoamericana 0.045. Comparadas con la prueba de Chi cuadrado para nuestra población y la población peruana se muestra que no hay diferencia significativa como se observa en el cuadro N° 10; en la comparación de nuestra población y la hispanoamericana se observa una diferencia significativa como se muestra en el cuadro N° 12.

En el marcador **D7S8**, el alelo de mayor frecuencia en la población ayacuchana fue el denominado **(A)** con 0.57, de igual manera en la población peruana e hispanoamericana, con 0.605 y 0.622, respectivamente. Y el alelo de menor frecuencia fue el denominado **(B)** que para la población ayacuchana fue 0.43, para la población peruana 0.395 y para la hispanoamericana fue 0.378. Comparadas con la prueba de Chi cuadrado de nuestra población tanto con la población peruana como con la población hispanoamericana no se encontraron diferencias significativas, como se muestran en los cuadros N° 10 y 12, respectivamente.

En el marcador **Componente Grupo Específico (GC)**, el alelo que se presentó con mayor frecuencia en nuestra población fue el denominado (C) con 0.57 que es igual en la población peruana con 0.57, en la población hispanoamericana es de 0.462. El alelo de menor frecuencia fue el denominado (A) para las tres poblaciones, siendo estas de 0.14, 0.18 y 0.203, respectivamente. Comparadas mediante la prueba de Chi cuadrado se obtiene que en la población ayacuchana y la población peruana no presenta diferencia significativa, como se muestra en el cuadro N° 10; mientras en la comparación entre la población ayacuchana y la población hispanoamericana se observa que existe diferencia significativa, mostrada en el cuadro N° 12.

En el cuadro N° 03, se determinó la frecuencia genotípica del locus HLA-DQA1 con la predominancia del genotipo homocigoto (3,3) con un 24%, seguido del genotipo heterocigoto (3,4.1) con un 20%, existen también pares de alelos que no se presentan.

El genotipo en identificación, se define como pareja de alelos existentes en un determinado locus. Cada locus existe en los dos cromosomas (uno que procede del padre, y otro que procede de la madre) que conforman cada una de las parejas. Cuando se analiza un locus, se obtiene obviamente información (alelos) de ambos cromosomas, expresada como números o letras. Cuando los dos alelos coinciden, se dice que el genotipo es homocigoto; cuando los alelos son diferentes, el genotipo es heterocigoto (Lorente y Lorente, 1995).

En el cuadro N° 04, se determinó la frecuencia genotípica de los loci PolyMarker para conocer las combinaciones de los pares de alelos de cada locus en forma independiente. Estos datos presentados nos sirven para obtener el porcentaje de genotipos homocigotos y heterocigotos, así como para determinar el Poder de Discriminación (PD), Probabilidad de Coincidencia (PC) y Probabilidad de Exclusión (PE).

En el cuadro N° 05 se encontró en la población ayacuchana en la combinación de los 6 loci estudiados un Poder de Discriminación (PD) mayor que 0.9991934 y la Probabilidad de Coincidencia (PC) menor que 0.0008066, mientras que para una población hispanoamericana con los 6 marcadores y un total de 200 muestras, se obtuvo un Poder de Discriminación de 0.9998 y una Probabilidad de Coincidencia de 0.0002.

También se presenta la Probabilidad de Exclusión (PE) obteniéndose como resultado 0.746204, esta prueba se realiza más para pruebas de paternidad. Los resultados de las pruebas de paternidad en los casos en los que están presentes todos los implicados tienen dos alternativas: exclusión o inclusión de la paternidad (Bravo, 1999).

En el cuadro N° 06, se presentan los datos de los genotipos homocigotos y heterocigotos observados, teniéndose mayor homocigosis en los loci LDLR, HBGG y D7S8, mientras que se tiene menor homocigosis en los loci HLA-DQA1 y GYPA; también se observa que existe una igualdad tanto de homocigosis y heterocigosis en el locus GC.

La ley de la distribución independiente enuncia que los genes que están en cromosomas diferentes se distribuyen en forma independiente durante la meiosis. Mientras el principio de la segregación se aplica al comportamiento de un solo par de genes, la ley de la distribución independiente describe el comportamiento simultáneo de dos o más pares de genes localizados en diferentes pares de cromosomas. Los genes que están en cromosomas separados se distribuyen independientemente durante la meiosis y la descendencia que resulta es híbrida en dos loci (De Robertis, 1997).

En el cuadro N° 07 se realiza el test del Equilibrio de Hardy – Weinberg de los 6 loci para la población ayacuchana, con los homocigotos y heterocigotos observados y esperados, en el cual no se encontró desviación significativa en la

prueba de Chi cuadrado en los cálculos del equilibrio. Estos datos concuerdan con Pérez, 2002, en la cual también no encuentra desviación significativa en la prueba de Chi cuadrado.

Como las poblaciones naturales no se encuentran nunca en equilibrio, en sentido estricto, es necesario determinar si las desviaciones son producto del azar, o si bien ha existido algún proceso, como pueden ser el aislamiento, la endogamia o la existencia de alelos nulos, que pudiesen haber provocado un exceso de homocigotos. Es conveniente señalar que esos procesos mencionados provocarían desviaciones del equilibrio en todos los marcadores y no sólo en un locus concreto, por lo que se esperaría una tendencia a la disminución del número de heterocigotos en todos los sistemas analizados (PharmaGen S.A., 1999).

En el cuadro N° 08, en el test de correlación de Karlín se encontraron valores de correlación bajos en las relaciones entre los locus LDLR/HBGG con 0.081000 y GYPA/HBGG con 0.087000; y valores de correlación altos en las relaciones entre los locus LDLR/D7S8 con 0.989000.

Si el coeficiente de correlación es igual a 1 se dice que la relación entre las variables es directa y perfecta. Si el coeficiente de correlación es igual a -1 entonces la correlación entre las variables es inversa y perfecta. Y si el coeficiente de correlación es igual a 0 entonces no existe ningún grado de relación entre las variables, en otras palabras las variables son totalmente independientes (Moya, 1991).

## VI. CONCLUSIONES

1. Las frecuencias alélicas de los seis loci o marcadores moleculares, los cuales corresponden al sistema DQA1 + PolyMarker™, y que se denominan según nomenclatura: HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y GC; estas frecuencias fueron halladas en 50 muestras (obtenidas de individuos voluntarios del distrito de Ayacucho), los cuales mediante un protocolo de tratamiento y la amplificación por PCR e hibridación en sondas por Dot Blot Reverso, se obtienen patrones de color azul, y al analizar la comparación de los resultados se observa que no se encontró muchas diferencias significativas en las frecuencias alélicas comparadas entre la población ayacuchana y la población peruana en los loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y GC, pero si una diferencia significativa con relación al locus HLA-DQA1. La comparación con poblaciones hispanoamericanas se observa que hay diferencias significativas en los loci HLA-DQA1, LDLR, HBGG y GC, y no hay diferencias significativas en los loci GYPA y D7S8.

2. Se realizó algunos cálculos que sirven para estimar la probabilidad de una igualdad producida al azar, estos resultados se utilizan para realizar cálculos en grupos de individuos de una determinada población, al cual pueda pertenecer

dicha muestra. En la combinación para los seis loci estudiados en el distrito de Ayacucho observamos que del Poder de Discriminación (PD) fue aproximadamente 0.9991934, la Probabilidad de Coincidencia (PC) de 0.0008066 y la Probabilidad de Exclusión igual a 0.7462040 (esta última utilizada más para pruebas de paternidad).

3. Se determinó en el locus HLA-DQA1 que es un ADN codificante, es uno de los más polimórficos que se detecta mediante las sondas, que reconocen 7 alelos (1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 4.1, 4.2/4.3) del sistema, observándose una mayor predominancia del alelo denominado (3) con un 44%, y en menor predominancia el alelo denominado (1.3) con un 1% para nuestra población. La interpretación para los otros 5 loci (PolyMarker), es más sencilla ya que las posibilidades (alelos) son dos (A y B) para LDLR, GYPA y D7S8; y para HBGG y GC hay tres alelos (A, B y C). Encontrando que uno de los locus más comunes es el marcador GYPA con el alelo denominado (A), así también el marcador D7S8 con el alelo denominado (A), en comparación con poblaciones peruanas e hispanoamericanas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda continuar con investigaciones referentes al campo de frecuencia genética en ADN con otros marcadores moleculares, pues así podremos conocer cuáles de los marcadores son más comunes y cuáles son menos frecuentes.
2. Afianzar las asignaturas de la Biología y Genética Molecular impartidos a la UNSCH, siendo ésta un campo muy interesante, ahora que se ha descifrado la secuencia de ADN, con el fin de llegar a conocer la organización completa de todo el material genético, así como otros estudios referidos a la salud, criminalística, recursos naturales, entre otros.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbas, A., Lichtman, A. y Pober, J. 1998.** Inmunología Celular y Molecular. 3ª edición. Interamericana McGraw – Hill. México.
2. **ADN y Genética Molecular.** URL: <http://www.biologia.edu.ar/adn/>
3. **Andradas, J. 1995.** El Análisis del ADN en los Vestigios Biológicos. Editorial RVC. Madrid.
4. **Ango, H. 1996.** Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Brucella spp* en biopsias de Médula Ósea. Tesis. UNMSM. Lima–Perú.
5. **Bravo, L. 1999.** Introducción a la Genética Forense: de las pruebas de paternidad. 1ra edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.
6. **Budowle, B. y Brown, B. 2001.** El Uso de ADN en la Identificación Forense. Revista Iberoamericana de Criminalística, Criminología, Medicina y Ciencias Forenses. Forénsica. Vol. 1, N° 1.
7. **Butter, J. 2001.** Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR markers. Academic Press. 1<sup>st</sup> edition.
8. **Carracedo, A. y Barros, F. 1996.** Problemas Bioestadísticas en Genética Forense. Edita Servicios de Publicaciones e Intercambio Científico. Campus Universitario Sur. Imprenta Universitaria. Universidad de Santiago de Compostela.
9. **Chip de ADN.** URL: [http://es.wikipedia.org/wiki/Chip\\_de\\_ADN](http://es.wikipedia.org/wiki/Chip_de_ADN).
10. **Chieri, P. y Zannoni, E. 1999.** Prueba del ADN: Identificación en Seres Humanos, Valor Probatorio, Determinación de la Paternidad, Jurisprudencia. El ADN en Criminalística y Derecho Penal. Editorial Astrea de Alfredo y Ricardo Desalma SRL. Buenos Aires.
11. **Cromosomas.** URL: <http://www.iqb.es/cancer/g006.htm#b>
12. **De Robertis, E. 1997.** Biología Celular y Molecular. 20ª edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires Argentina.
13. **Dubinín, N. 1981.** Genética General I. Ediciones MIR. Moscú.
14. **Garayar, C. 2003.** Atlas Departamental del Perú: Ayacucho. Ediciones Peisa S.A.C. Lima.
15. **García, F., Jonquera, H. y Lorente, J. A. 2002.** Bases de Datos Genéticos de Identificación Criminal. 1ª edición. Editorial Universidad la República. Santiago de Chile.

16. **Griffin, H. y Griffin, A. 1994.** PCR Technology: Current Innovations. Editorial CRC Press. Editado por Hugo G. Griffin y Annette M. Griffin. Florida.
17. **Instituto Nacional de Salud. 1998.** Curso Teórico – Práctico: “PCR – Hibridación”. Lima – Perú.
18. **Instituto Nacional de Estadística e Informática.** Perfil Sociodemográfico del Perú. Lima: INEI, 2008.
19. **Laboratory Division, FBI. 1999.** Protocolos para la Tipificación de ADN Basados en PCR. Spanish. Washington D.C.
20. **Lorente, J. A. y Lorente, H. 1995.** El ADN y la Identificación en la Investigación Criminal y en la Paternidad Biológica. Editorial Comares. Granada – España.
21. **Marcadores Genéticos.** URL: <http://www.allelyus.com>.
22. **Moya, R. 1991.** Estadística Descriptiva: Conceptos y Aplicaciones. Editorial San Marcos. Lima – Perú.
23. **PE Applied Biosystems. 1995.** AmpliType PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kits. Manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures. Applied Biosystems Division. New Jersey. USA.
24. **Pérez, L. 2002.** Genética Poblacional de 19 loci en seis ciudades del Perú. Tesis. Escuela de Post-Grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima.
25. **PharmaGen. 1999.** Utilización de la Tecnología del ADN en el Ámbito Policial y Judicial. Revista. Madrid.
26. **Rothhammer, F. 1977.** Genética en Poblaciones Humanas. Monografía N° 15. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington D. C.
27. **Waker, J. M. y Gingolg, E. B. 1997.** Biología Molecular y Biotecnología. 2º edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza.
28. **Wallace, R. 1991.** Biología Molecular y Herencia. Editorial Trillas. México.
29. **Walsh, J. M., Fildes, N., Louie, A. y Higuchi, R. 1991.** Report of the Blind Trial of the Cetus AmpliType HLA DQ $\alpha$  Forensic Deoxyribonucleic Acid (DNA) Amplification and Typing Kit. Journal of Forensic Sciences. JFSCA. Vol. 36 N° 5.

30. **Weir, B. 1996.** Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland. Massachusetts. Printed in Canada.
31. **Whatman, BIOScience. 1999.** Manual FTA® Technology: Collect, Transport, Archive and Purify Nucleic Acid. WB120047.
32. **Yunis, E. y Yunis, J. 2002.** El ADN en la Identificación Humana. Editorial TEMIS, S. A. Bogotá – Colombia.

## **ANEXOS**

**ANEXO N° 01**

**FICHA DE DATOS GENERALES PARA ESTUDIO DE FRECUENCIA  
GENÉTICA**

CÓDIGO:.....

**1. DATOS PERSONALES:**

Apellidos y Nombres : .....

Documento de Identidad : .....

Lugar de Nacimiento : ..... Fecha: .....

Departamento : ..... Provincia : .....

Dirección : .....

Distrito : .....

Tiempo de Residencia en:

Dpto : .....

Distrito : .....

Ocupación : .....

Sexo:

**2. ANTECEDENTES FAMILIARES:**

Nombre del Padre : .....

Lugar de Nacimiento : .....

Nombre de la Madre : .....

Lugar de Nacimiento : .....

Número de Hermanos : Varones:..... Mujeres:.....

Observaciones:.....

.....

.....

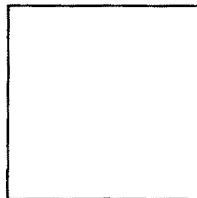
.....

.....

3. CARTA DE COMPROMISO:

Por la presente **autorizo** voluntariamente la extracción de sangre de mi persona con fines de llevar a cabo los estudios de Frecuencia Genética.

INDICE DERECHO



Ayacucho,..... de ..... del 2003

4. MUESTRA:

Sangre capilar ( )

Otros:.....

5. RESULTADOS:

FECHA	MARCADORES	RESULTADOS	OBSERVACIONES
	HLA		
	LDLR		
	GYPA		
	HBGG		
	D7S8		
	GC		

## ANEXO N° 02

### Localización Cromosómica de los Loci de PolyMarker y DQA1

	HLA-DQA1	LDLR	GYPA	HBGG	D7S8	GC
Localización Cromosomal	6p21.3	19p13.1-13.3	4q28-31	11p15.5	7q22-31.1	4q11-13
Productos del PCR (pb)	239/242	214	190	172	151	138
Número de alelos distinguidos	<b>7*</b>	<b>2</b>	<b>2**</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

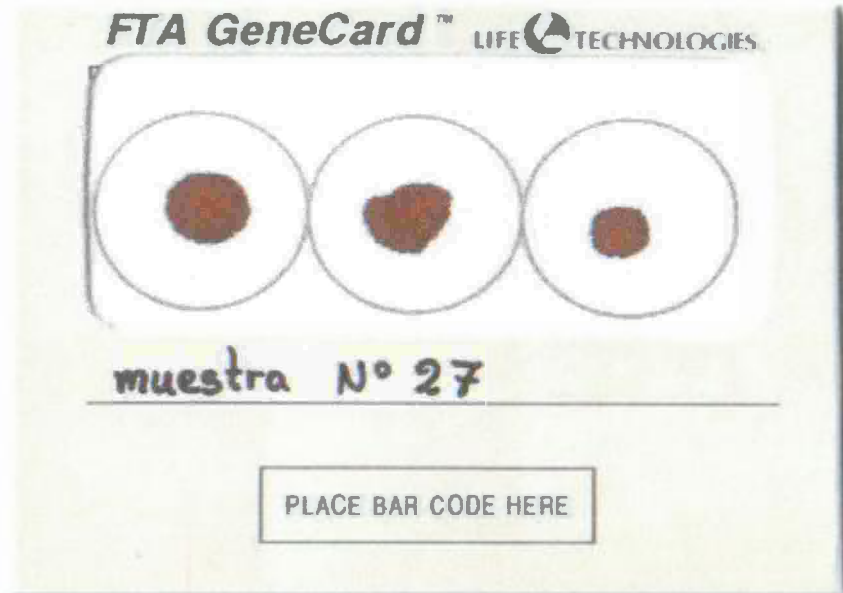
\* Para el HLA-DQA1 los alelos 4.2 y 4.3 son detectados, pero no distinguidos uno del otro utilizando sondas de ADN del AmpliType HLA DQA1.

\*\* Para GYPA el alelo A y A' son detectados, pero no distinguidos uno del otro utilizando sondas de ADN del AmpliType PM.

Fuente: AmpliType PM + DQA1 PCR Amplification and Typing Kits, Manual for Forensic or Research Use Only not for Use in Diagnostic Procedures, Perkin Elmer (40).

### ANEXO N° 03

- a. Tarjetas FTA™ usadas en la toma de muestra de sangre



- b. Extracción con la solución de purificación de FTA





c. Preparación del Mix de Amplificación con las muestras de ADN



d. Ultracentrifugación de los tubos para reacción de PCR



e. Proceso del PCR para la amplificación del ADN



f. Proceso de hibridación con las sondas utilizando bandejas de tipificación en baño maría

