

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Fundada en 1551

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



Tesis

Digitales UNMSM

“ESTIMACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL D16S539 EN UNA MUESTRA POBLACIONAL DE ASCENDENCIA ANDINA ANCASHINA”

TESIS

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

AUTOR

RAÚL YHOSSEF TITO TADEO

**LIMA – PERÚ
2003**

*A mis padres y
A mi familia*

Mi agradecimiento a la Dra. Beatriz Lizárraga de Olarte por la oportunidad y ayuda brindada en la realización del presente trabajo y al centro de investigación de Bioquímica y Nutrición de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos donde se realizó el trabajo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
ANTECEDENTES	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
EQUIPOS Y MATERIALES	13
MÉTODOS	17
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
SUGERENCIAS	38
ANEXOS	39
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

RESUMEN

El empleo de marcadores moleculares como los microsatélites del DNA humano son de mucha importancia en los estudios de filiación e identificación en la práctica forense, estos estudios se basan en las frecuencias alélicas de los microsatélites o marcadores genéticos del DNA, que para el caso del Perú están supeditados a las frecuencias alélicas reportadas para la población hispanoamericana. Este trabajo tiene como objetivo determinar si existe diferencia significativa entre las frecuencias alélicas del microsatélite D16S539 de la muestra poblacional de ascendencia ancashina y la hispanoamericana. Los estudios genéticos, como la identificación de los genotipos de los individuos y la determinación del equilibrio genético de la población fueron realizados en una muestra de 33 individuos no emparentados usando la técnica de PCR seguida por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% 7M urea y tinción con nitrato de plata, encontrándose 5 alelos de 9 reportados para el D16S539 (Steven y col., 1998), siendo la frecuencia del alelo 9 igual a 0.242, 10 igual a 0.258, 11 igual a 0.288, 12 igual a 0.106 y 13 igual a 0.106. La población estudiada se encontró en equilibrio de Hardy–Weinberg con respecto a este marcador y además no existía diferencia significativa entre las frecuencias alélicas del D16S539 de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina y la hispanoamericana.



SUMMARY

The use of microsatellites, as molecular markers of human DNA, are important in the studies of affiliation and identification in forensic practices. These studies are based on allelic frequencies in certain populations. For example, in Peru the frequencies reported are often for Hispano-Americans. This research attempts to determine if significant differences among allelic frequencies of the microsatellite D16S539 exist between two populations: a Peruvian Ancash sample and a general sample of Hispano-Americans. Genetic populations studies were carried out in a sample of 33 nonrelated individuals using PCR followed by 8% polyacrilamide gel electrophoresis and silver staining. The population presented 5 alleles of the 9 found for the D16S539 microsatellite, with the respective frequencies: 9 (0.242), 10 (0.258), 11 (0.288), 12 (0.106) and 13 (0.106). The population in study was found to be in Hardy–Weinberg equilibrium with regard to this marker and there were no significant differences between the allelic frequencies of the population of Ancash origin, and general sample of Hispano-Americans.

ANTECEDENTES

Los estudios del genoma humano han revelado la existencia de secuencias repetitivas en tándem en muchos sitios a lo largo de todos los cromosomas, que varían en el número de veces que la unidad de repetición está presente (Jeffreys y col., 1985; Nakamura, y col., 1987; Weber y May, 1989). Estas regiones fueron identificadas usando sondas complementarias a la unidad de repetición, contenida en los fragmentos obtenidos de la digestión del DNA genómico por enzimas de restricción en la técnica denominada **Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción (RFLP)**, "*Restriction Fragment Length Polymorphism*", ampliamente trabajada en la determinación de minisatélites de la mioglobina humana (Jeffreys y col., 1985).

Cuando la unidad repetitiva del marcador genético es corta, de 2 a 5 nucleótidos, se les denomina microsatélites, o **Repeticiones cortas en tándem (STR)** "*short tandem repeats*", mientras que si la secuencia repetitiva es de 9 a 64 nucleótidos se les denomina minisatélites. También se ha acuñado el término **Repeticiones en tándem de número variable (VNTR)**, "*variable number tandem repeat*", para designar a los minisatélites, aunque esto se presta a confusión porque todos estos polimorfismos, finalmente, representan alguna forma de repetición en tándem (Nakamura y col., 1987), que son comúnmente usados en las técnicas del DNA Fingerprinting o Huella dactilar del DNA. En el genoma nuclear se han descrito miles de microsatélites multialélicos con un alto grado de heterocigosidad, más de 70 %, en todas las poblaciones estudiadas hasta la fecha (Cabrera y col., 1995; Edwards y col., 1991b). Los microsatélites también han resultado de mucha utilidad para resolver casos de paternidad dudosa y de identidad (Alford y col., 1994; Hagelberg y col., 1991). En contraste, los marcadores clásicos de tipo sanguíneos, proteínas séricas, HLA, etc., son muy pocos y presentan una baja heterocigosidad. Por tanto la tendencia en el ámbito mundial es la de utilizar repeticiones tri, tetra y pentanucleotídicas

(Ruitberg y col., 2001), muchas de las cuales tienen alelos pequeños, fáciles de resolver aún en geles de agarosa. Además se ha visto que estas son estables durante el proceso de amplificación y tienen una tasa de mutación más baja durante la replicación que las repeticiones dinucleotídicas. La secuencia de las repeticiones en tándem de los STRs puede ser flanqueada con iniciadores o también llamados primers, los que permiten la amplificación de la región que flanquean por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) “*Polimerase Chain Reaction*” (Saiki y col., 1985), produciendo una amplificación enzimática de cientos de copias de la región del DNA de interés.

En el caso del STR D16S539 (Gen Bank G07935 que presenta 11 repeticiones) localizado en el cromosoma 16, contiene repeticiones del tipo $(GATA)_N$ (Benson y col., 1999), donde N puede ser 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15.

Usando los iniciadores para el STR D16S539 del Cooperative Human Linkage Center, reportados por Murray, después de realizada la amplificación mediante PCR, se obtuvieron fragmentos en el rango de 133 – 173 pares de bases, (Tabla 1). Esto genera suficiente DNA para el análisis a partir de raíces de cabellos o cabellos, pulpa de diente, fragmentos de hueso, tejidos, semen, orina y sangre, demostrando que sólo es necesario pocos nanogramos de DNA para una satisfactoria PCR.

El análisis de las regiones amplificadas nos revela el número de unidades repetidas del tetranucleótido en la muestra. Una persona hereda igual cantidad de DNA nuclear de cada padre, por tanto, uno hereda una copia del D16S539 de la madre y la otra copia del padre.

Tabla 1. Tamaño en pares de bases y número de repeticiones de cada alelo del STR D16S539 usando los iniciadores reportados por Murray.

Alelos	Fragmento amplificado	Número de Repeticiones
5	133 bp	[GATA] ₅
8	145 bp	[GATA] ₈
9	149 bp	[GATA] ₉
10	153 bp	[GATA] ₁₀
11	157 bp	[GATA] ₁₁
12	161 bp	[GATA] ₁₂
13	165 bp	[GATA] ₁₃
14	169 bp	[GATA] ₁₄
15	173 bp	[GATA] ₁₅

La variabilidad en el D16S539 de abuelos a padres e hijos es un ejemplo de la distribución de los alelos (Fig. 1). Para este ejemplo cada copia de D16S539 tiene diferente número de unidades (GATA) repetidas, el abuelo materno tiene un cromosoma 16 con (GATA)₅ en su STR D16S539, y en el otro cromosoma 16 presenta (GATA)₉ en su STR D16S539, su hija hereda el STR (GATA)₅ y el STR (GATA)₈ de su esposa. El parentesco del hijo con el padre puede ser seguido o confirmado mediante este marcador.

En situaciones reales, no basta analizar un STR, por ejemplo, un cabello encontrado en la escena de un crimen con (GATA)₈ y (GATA)₁₄ en el STR D16S539 no significaría elegir automáticamente al hijo D como sospechoso. Hay cientos de personas no relacionadas con este mismo patrón genético para este STR. Sin embargo una comparación de tres STR, D16S539, D13S317 y D7S820, por ejemplo da una probabilidad de 1 en 2000, de que los DNAs sean de la misma persona, es decir que tengan el mismo patrón genético para estos tres STRs, cuando se

emplean 9 STR la probabilidad lograda es de 1 en un billón. Este grado de certeza en el emparejamiento es usado en la identificación de restos de militares que presentan un alto grado de destrucción del cuerpo o en el caso de tragedias como incendios, en los cuales los cuerpos han quedado irreconocibles usando métodos convencionales como comparaciones antemorten y postmorten de fotografías, comparación dental intraoral y extraoral o radiografías (Martín de las Heras y col., 1999).

Este análisis esta siendo usado además en animales en la elaboración de heredogramas comúnmente conocidos como pedigrís, análisis de filiación, mediciones de índices de consaguinidad, determinación de especies y razas en peligro o en vías de extinción (Ruiz García, M & J. Jordana., 2000).

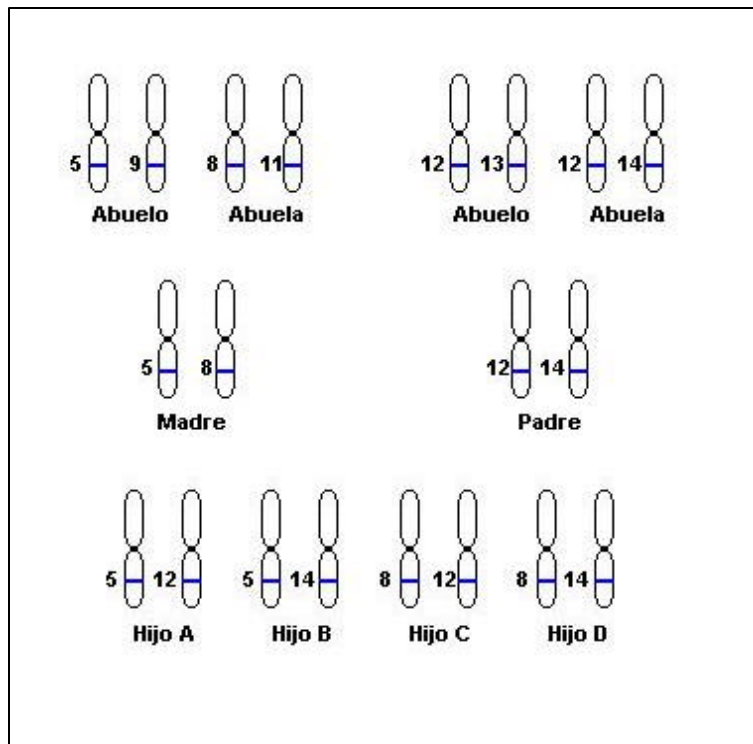


Fig. 1 Herencia del STR D16S539 (16q22 – 24) en tres generaciones.

Las frecuencias alélicas del D16S539 para las poblaciones hispanoamericana, afroamericana y caucásicoamericana (Steven y col., 1998), además de otros grupos poblacionales americanos, han sido ya reportadas a nivel mundial, (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias alélicas del D16S539 en las poblaciones Hispano-Americana, Afro-Americana y Caucásico-Americana, según Steven y col., 1998.

D16S539			
Población	Hispano Americana	Afro Americana	Caucásico americana
Homocigotos	45	48	57
Heterocigotos	162	167	153
Total de muestras	207	215	210
Alelos	Frecuencia	Frecuencia	Frecuencia
5	0.000	0.002	0.000
8	0.012	0.023	0.026
9	0.101	0.205	0.107
10	0.181	0.093	0.079
11	0.300	0.316	0.319
12	0.268	0.202	0.269
13	0.118	0.133	0.167
14	0.019	0.026	0.031
15	0.000	0.000	0.002
	1.000	1.000	1.000

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El empleo de marcadores genéticos particularmente de secuencias repetidas en tándem del DNA para la identificación de individuos, es una herramienta fundamental para los análisis forenses, estudios de mapeo y diagnóstico de enfermedades (Edwards y col., 1991a). La mayoría de marcadores empleados para la población peruana están condicionados a frecuencias alélicas que usan como muestra poblacional grupos de inmigrantes hispanoamericanos que viven en los Estados Unidos de Norteamérica (Pena & Chakraborty, 1994).

Estas frecuencias alélicas para el D16S539 podrían no ser un reflejo cercano del acervo genético de la población peruana. Por eso es conveniente tener frecuencias alélicas para marcadores basadas en muestras representativas de la población peruana. Así mismo, además de desconocer las frecuencias alélicas para este marcador, no se sabe si todos los alelos están presentes en la población peruana, por lo que en estudios de tipificación humana es necesario usar las frecuencias alélicas globales para hispanoamericanos. Dicha problemática conlleva a elevar el costo de estos tipos de análisis, ya que se deben emplear varios marcadores para dar un resultado confiable. El realizar una comparación de las frecuencias reportadas para la población hispanoamericana con datos de la población peruana, sería una forma de determinar muy cercanamente cuanta correlación existe entre estos datos.

El problema radica en la capacidad de procesamiento de muestras y disponibilidad de material. Es por eso necesario el diseño de una metodología adecuada a nuestra realidad como país en vías de desarrollo. La comparación de las frecuencias del D16S539 en una muestra poblacional de ascendencia andina ancashina con las frecuencias hispanoamericana, nos daría un modelo de metodología a seguir a nivel de todo el Perú.

JUSTIFICACIÓN

El amplio uso actualmente de marcadores del DNA, tales como RFLP, VNTR y los microsátélites o STR han revolucionado notablemente la tipificación de individuos. Estos STRs son muy usados en la práctica forense, para poder establecer relaciones de parentesco entre individuos en los casos de filiación y delitos contra la libertad sexual. Además son empleados en el análisis de secuencias conservadas, y ligamiento, para ubicar genes de interés. El desarrollo de este trabajo permitió obtener una metodología adecuada para el análisis del STR D16S539, además por ser este STR tan pequeño, se tuvo que desarrollar una metodología de visualización muy sensible para obtener una buena separación de fragmentos. Este STR por tener una secuencia corta puede ser usado en muestras de DNA que estén muy degradadas, ya sea por el tiempo o por condiciones medioambientales, ideal para los estudios del DNA antiguo. Además este trabajo proporcionó datos de la población ancashina para este marcador, valoró su potencial utilidad en estudios de caracterización genética, tanto desde el punto de vista técnico del análisis del polimorfismo como en lo que se refiere a su grado de variabilidad.

HIPÓTESIS

H_0 : EXISTE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL MARCADOR **D16S539** REPORTADAS PARA LA POBLACIÓN HISPANOAMERICANA Y LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LA MUESTRA POBLACIONAL EN ESTUDIO.

H_A : NO EXISTE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL MARCADOR **D16S539** REPORTADAS PARA LA POBLACIÓN HISPANOAMERICANA Y LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LA MUESTRA POBLACIONAL EN ESTUDIO.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Establecer una base de datos de las frecuencias alélicas del marcador D16S539 en la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estandarización de la metodología.
- Determinar las variaciones alélicas del D16S539 en la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina.
- Determinar las frecuencias alélicas del D16S539 en la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina.
- Determinar si la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina se encuentra en equilibrio genético con respecto a este marcador.
- Comparar las frecuencias alélicas del D16S539 de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina y las frecuencias reportadas para la población hispanoamericana.

EQUIPOS Y MATERIALES

EQUIPOS

- Termociclador (Perkin Elmer, 2400)
- Baño María (Thelco USA)
- Centrífuga (Sorvall)
- Micro centrífuga (Usa- Scientific)
- Vortex
- Fuente de poder (LKB)
- Transiluminador de luz ultra violeta
- Balanza analítica (Ohaus)
- Cámaras electroforéticas verticales caseras.
- Lámpara germicida de luz ultra violeta.
- Cámara fotográfica profesional (Penthax)



Estimación de las Frecuencias Alélicas del D16S539 en una Muestra Poblacional de ascendencia andina ancashina. Tito Tadeo, Raúl Yhossef.

Derechos reservados conforme a Ley

MATERIALES:

- Tubos Venoject®II EDTA (K₃) estériles.
- Células: leucocitos.
- Cebadores o primers D16S539, Forward 5´GAT CCC AAG CTC TTC CTC TT 3´, Reverse 5´ACG TTT GTG TGT GCA TCT GT 3´. (BIO.SYNTHESIS Lot No D613-7 y Lot D613-8)
- Marcadores de pares de bases de DNA.
- Tips con filtro de 2, 10, 100 y 1000 µl.

REACTIVOS:

- EDTA (SIGMA)
- Cloruro de amonio (MERCK)
- Bicarbonato de potasio (MERCK)
- Cloruro de sodio (SIGMA)
- Sodio dodecil sulfato (SIGMA)
- Acetato de amonio (SIGMA)
- Ácido bórico (SIGMA)
- Nitrato de plata
- Tiosulfato de sodio (SIGMA)
- Persulfato de amonio (SIGMA)
- Agarosa (Life Technologies)
- Acrilamida (SIGMA)
- Bis-acrilamida (SIGMA)
- Tris - HCl (SIGMA)
- TEMED (SIGMA)
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Etanol
- Kit de PCR (Applied Biosystems): TaqGold polimerasa, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), dNTP's, buffer 10X de la TaqGold.
- Bromuro de etidio (SIGMA)
- Ácido acético glacial (MERCK)

Población de Estudio.-

Mediante campañas de salud, realizadas en el Asentamiento Humano El Carmen-Independencia-LIMA y Chancay Puerto-LIMA que proporcionaron evaluación médica general por el personal medico especializado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se seleccionó una muestra de personas para participar en el estudio. A estos participantes se les ofreció información y se les aplicó una encuesta para la participación en el presente estudio, en la cual los participantes de manera libre y voluntaria, se ofrecieron como donantes de 5 ml de sangre.

Tamaño de la Muestra.-

La muestra estuvo constituida por 33 personas no emparentadas entre si, aparentemente sanas, las cuales cumplían los criterios de inclusión, (Tabla 3).

Criterios de Inclusión:

Personas mayores de 18 años.

Personas cuya ascendencia de dos generaciones atrás provenga de las localidades de la región andino ancashina.

Personas que acepten participar en el estudio y firmar el compromiso de participación.

Criterios de Exclusión:

Personas menores de 18 años.

Personas cuya ascendencia de dos generaciones atrás no provenga de las localidades de la región andino ancashina.



Estimación de las Frecuencias Alélicas del D16S539 en una Muestra Poblacional de ascendencia andina ancashina. Tito Tadeo, Raúl Yhossef.

Derechos reservados conforme a Ley

Personas que no acepten participar en el estudio.

Muestras biológicas estudiadas:

Se obtuvieron muestras de sangre de 33 individuos que cumplían los criterios de inclusión y cuya procedencia de los abuelos era de alguna localidad andino ancashina, (Tabla 3 y Mapa 1).

MÉTODOS

Recolección de la muestra.-

La colección se realizó por extracción de sangre venosa mediante el sistema de vacío usando los tubos vacutainer Venoject®II EDTA (K₃) estériles. Los leucocitos y plaquetas se obtuvieron por centrifugación, para lo cual los 5 ml de sangre total colectados en el tubo vacutainer fueron vertidos en un tubo Falcon de 50 ml, a los que se le agregó 45 ml de buffer de hemólisis (0.155 M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, EDTA pH 7.9, previamente autoclavada) y se agitó suavemente. Después de incubar a 5°C durante 45 minutos se centrifugó a 3000 rpm por 25 minutos. El sobrenadante hemolisado fué descartado directamente, es decir colocando en posición invertida rápidamente el tubo y vertiendo el hemolisado al recipiente con lejía; el precipitado de glóbulos blancos fue congelado a – 20°C.

Extracción del DNA.-

Para purificar el DNA, se utilizó el método de cloroformo – alcohol isoamílico (Marmur, 1961), para lo cual los precipitados de glóbulos blancos se resuspendieron en 1 ml de solución de lisis celular (10 mM TrisHCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS) y se incubó a 50°C por 24 horas (Strauss, 1994). A los glóbulos blancos lisados se agregó 4 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente por 25 minutos y se centrifugó a 6500 rpm por 15 minutos (Strauss, 1994). La fase superior acuosa se recuperó, y se le agregó 4 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) hasta que no haya interfase. El DNA contenido en la fase acuosa se precipitó con 10 ml de etanol de 96° helado, mediante una pipeta Pasteur el DNA precipitado se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, luego se lavó dos veces con etanol de 70° helado y se secó el exceso de

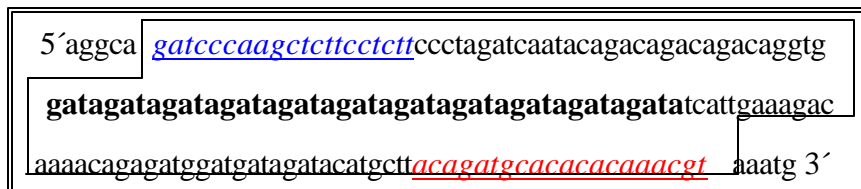
alcohol de las muestras evaporándolo en una estufa de 37°C. El DNA seco se resuspendió en 500 µl de buffer TE (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1mM EDTA) y se colocó en un baño de temperatura a 37°C por 12 horas. Las muestras del DNA completamente resuspendidas se almacenaron a – 20°C.

Cuantificación del DNA.-

Cada solución de DNA fue diluida (1:10), en agua milliQ. A estas diluciones se les midió la absorbancia en un espectrofotómetro (LKB), empleando celdas de cuarzo de 1 ml y se tomaron las lecturas a 260 y 280 nanómetros (nm). Con los datos de las lecturas se obtuvieron las concentraciones de las muestras de DNA, (Tabla 4).

Amplificación del DNA.-

Se usó la técnica de la PCR con los cebadores diseñados D16S539 CHLC, F (forward) 5´GAT CCC AAG CTC TTC CTC TT 3´, R (reverse) 5´ACG TTT GTG TGT GCA TCT GT 3, reportados por Murray y col., 1995, para flanquear la región del STR D16S539 en el cromosoma 16.



Se realizaron variaciones en las concentraciones de los componentes de la PCR, con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para la obtención del fragmento amplificado. Para un volumen de 25 microlitros (µl) de reacción se comenzó usando 100 nanogramos (ng) de DNA, 0.75 U de

TaqGold, 150 μ M de cada dNTPs, 800 μ M de cada cebador, 2.5mM de $MgCl_2$ y 2.5 μ l de Buffer 10X de la TaqGold. El programa de amplificación base usado en el termociclador fue 9 minutos a 95°C y 35 ciclos de 30 segundos a 95°C (denaturación), 75 segundos a 55°C (alineamiento) y 30 segundos a 72 °C (extensión) y finalmente 6 minutos a 72°C (extensión final).

Optimización de las condiciones y programa de amplificado para la obtención de los alelos del D16S539:

Variación de concentración de $MgCl_2$:

Usando el programa de amplificación y las condiciones iniciales de concentración de TaqGold, dNTPs, cebadores, y buffer 10X de la TaqGold, se probó las concentraciones de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mM de $MgCl_2$, para obtener la menor cantidad de productos inespecíficos.

Modificación del programa de amplificación:

El programa de base de amplificación constaba de 35 ciclos y 55°C de temperatura de alineamiento de los primers. Se probaron programas de amplificación con 25, 27 y 30 ciclos para temperaturas de alineamiento de 56°C y 57.5°C, de forma independientemente.

Variación de la cantidad de DNA molde:

Se probaron diferentes concentraciones de DNA molde para disminuir los fragmentos inespecíficos, empleándose desde 7.5 a 150 ng por cada muestra.

Amplificación del marcador multialélico:

Después de optimizar el programa y las condiciones adecuadas para la amplificación, se procedió a construir un estándar o marcador multialélico (Tito y Lizárraga, 2001) para identificar los alelos

presentes en la población en estudio. Se realizó 4 mezclas equimolares de 80 **DNAs** de individuos de diferentes localidades del Perú (datos no mostrados para este trabajo). Los fragmentos o alelos amplificados de las mezclas se identificaron usando el fragmento de 134 y 154 bases, correspondiente al estándar comercial de número de bases conocido (1 Kb Ladder, Life Technologies), (Foto 3). Después de identificar los alelos, los resultados fueron confirmados mediante un analizador genético (ABI Prist, 310 Genetic Analyzer) en el laboratorio de Biología Molecular de la Policía Nacional, (Foto 4).

Amplificación de las muestras de la población en estudio:

Para un volumen de 25 μ l de reacción se empleó 75 ng de DNA molde por cada muestra, 0.75 U de TaqGold, 150 μ M de cada dNTPs, 150 mM cada cebador, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 2.5 μ l de buffer 10X de la TaqGold. Las muestras se amplificaron en grupos de 8, para lo cual se preparaba un Mix PCR para ser repartido en los 8 tubitos (Tabla 5). En los 6 primeros se colocó muestras de DNA, en el penúltimo la mezcla de DNAs que amplificaba el marcador multialélico y en el último agua milliQ en lugar de DNA. Toda la etapa de preparación del Mix PCR se realizó en un recipiente con hielo. El programa de amplificación estandarizado usado en el termociclador (Perkim Elmer, 2400) fue 9 minutos a 95°C, 27 ciclos de 30 segundos a 95°C, 75 segundos a 57.5°C, 30 segundos a 72°C y finalmente 6 minutos a 72°C.

Tabla 5. Volúmenes de los componentes de la reacción de PCR. En A se consigna los volúmenes empleados para la preparación del MIX PCR, y en B los volúmenes del MIX PCR, muestras de DNA y agua milliQ usado para cada tubo de 200 μ l, para un volumen final de reacción de 25 μ l. En el caso de los primers se agrega al MIX PCR 4 μ l del Forward y 4 μ l del Reverse.

A		B								
MIX PCR D16S539	μ l	TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8
Buffer 10 X	20	MIX PCR	7	7	7	7	7	7	7	7
MgCl ₂	12	DNA (μ l)	x	x	x	x	x	x	x	0
dNTPs 10 mM	12	H ₂ O	18-x	18-x	18-x	18-x	18-x	18-x	18-x	18
Primers 20 pmol (4c/u)	8	Vf (μ l)	25	25	25	25	25	25	25	25
TaqGold 5U/ μ l	1.2									
H ₂ O	2.8									
Vf (μ l)	56									

Visualización de los fragmentos amplificados.-

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa y de poliacrilamida al 8% 7M Urea (acrilamida-bis 38:2, según Barton & Albrigh, 1994).

Electroforesis en geles de agarosa.-

Se usaron geles de agarosa al 2 %, bromuro de etidio al 0.33 %, buffer de corrida TBE 1X (890 mM TrisBase, 890 mM ácido bórico, 20 mM EDTA pH 8.0) y buffer de muestra (azul de bromofenol 0.25 %, xilencyanol 0.25 %, TBE 1X, 1g/ml sucrosa). Para ver la calidad de DNA, 5 μ l de cada muestra fue mezclada con 1 μ l de buffer de muestra y se sembraron en los pozos del gel. Para observar la presencia de amplificado, 15 μ l de cada amplificado fue mezclado con 2 μ l de buffer de muestra y sembrado en los pozos del gel. Se usaron como estándares de tamaño: ϕ X174 RF DNA, cat No. 25260-019 GIBCO BRL Life Technologies, Phi X174 RF DNA Hae III Digest,

Low DNA Mass™ Ladder Cat No. 10068013 GIBCOBRL Life Technologies, de cada uno se sembró 0.5 µg. La electroforesis se realizó a 90 voltios constante durante 1 hora a temperatura ambiente, inmediatamente después se transiluminó el gel.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.-

Se usaron geles de poliacrilamida al 8 % 7 M de urea TBE 1X, se usó un stock de acrilamida 38:2 (38g de acrilamida y 2g de bisacrilamida). (Tabla 6). Las cámaras electroforéticas verticales usadas fueron de 20 cm, 35cm y 45 cm. de largo. Para separar los fragmentos amplificados, 10 µl de cada amplificado se mezcló con 4 µl de buffer de muestra formamida (10% sucrosa, 0.02% azul de bromofenol, 0.02% xilen cianol, v/v 90 ml formamida desionizada, completar a 100 ml con agua destilada). Se usó como buffer de corrida TBE 1X y las electroforesis se realizaron a 180 voltios constante, durante 24, 48 o 72 horas, dependiendo de la cámara empleada, en todos los casos se aplicó una preelectroforesis de 1 hora a temperatura ambiente. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó usando tinción con nitrato de plata, (Bassam y col., 1991), el gel se fijó en la solución A de ácido acético glacial, durante 20 minutos Se descartó la solución y se lavó dos veces el gel con un volumen igual al de la solución anterior de agua bidestilada por 2 minutos. Después se le agregó la solución B de nitrato de plata (AgNO₃, formaldehído 37%) por 10 minutos, después de los cuales se descartó la solución B y se lavó el gel una sola vez por 1 minuto. Se agregó la solución C reveladora (NaCO₃H₂O, tiosulfato de sodio, formaldehído 37%) hasta que se observen las bandas, inmediatamente después se agregó solución A para detener la reacción, (Tabla 7). Los geles revelados fueron colocados en vinifan y posteriormente fotografiados y escaneados.

Tabla 6. Composición de los geles de poliacrilamida al 8% 7M urea.

Se indica los volúmenes de solución de acrilamida: bisacrilamida, TBE 10X, TEMED, APS 10%, ddH₂O (agua bidestilada) y la cantidad de urea empleada en la cámara de 45 cm (60 ml), 35 cm (40 ml) y 20 cm (20 ml).

Volumen	Urea (g)	Stock 38:2 Acrilamida (ml)	TBE 10 X (ml)	ddH ₂ O (ml)	TEMED (μl)	APS 10% (μl)
60 ml	25.2	12	6	21	61.2	300
40 ml	16.8	8	4	14	40.8	200
20 ml	8.4	4	2	7	20.4	100

Tabla 7. Tinción con plata de geles de poliacrilamida. Se indica la composición de las soluciones empleadas para realizar la tinción de los geles de diferente tamaño.

Solución A	GELES	
	20 cm	35 cm ó 45 cm
Ácido acético glacial (ml)	29	58
ddH ₂ O (ml)	379	758
Sol B	20 cm	35 cm ó 45 cm
AgNO ₃ (g)	0.5825	1.165
Formaldehído 35% (μl)	620	1140
dd H ₂ O (ml)	387.5	775
Sol C	20 cm	35 cm ó 45 cm
NaCO ₃ H ₂ O (g)	13.598	27.196
Tiosulfato (μl)	38.75	77.5
dd H ₂ O (ml)	387.5	775
Formaldehído 35% (μl)	620	1140
dd H ₂ O por lavada	250	500

Análisis de resultados

En este trabajo la variable independiente fue la población en estudio, la cual permaneció constante durante todo el análisis y la variable dependiente fueron las frecuencias alélicas de esta población, las cuales estaban en función del contenido genético de la población.

Identificación de los alelos del marcador multialélico y determinación de las variaciones alélicas de la población.-

La identificación de los alelos del STR D16S539 presentes en el marcador multialélico y en la población de ascendencia andina ancashina, se realizó mediante una comparación de los alelos con fragmentos de DNA de número de pares de bases conocido, para poder determinar el número de repeticiones del tetranucleótido GATA para cada alelo.

Determinación de las frecuencias alélicas de la población.-

La determinación de las frecuencias alélicas de la población estudiada se realizó amplificando cada una de las muestras de DNA. Además se escogieron al azar 20% de las muestras para amplificarlas de nuevo y confirmar los resultados. Los alelos de cada individuo fueron identificados usando el marcador multialélico. Finalmente se estimó la presencia de cada uno de los 5 alelos (9, 10, 11, 12 y 13) del D16S539 en los 33 individuos analizados (66 cromosomas) de forma manual y usando el software PowerStats (Allan Tereba, 1999).

Análisis de equilibrio genético y comparación de frecuencias.-

Para determinar si la población de ascendencia andina ancashina se encontraba en equilibrio genético



Estimación de las Frecuencias Alélicas del D16S539 en una Muestra Poblacional de ascendencia andina ancashina. Tito Tadeo, Raúl Yhossef.

Derechos reservados conforme a Ley

con respecto al marcador D16S539 se empleó la hoja de calculo Excel y el software Genetic Data Analysis GDA (Lewis, 2001). Para comparar las frecuencias alélicas de la población estudiada con las frecuencias reportadas de la población hispanoamericana se empleó el software Arlequin (Stefan y col. 2000).

RESULTADOS

Banco de DNAs:

- Se obtuvieron 33 muestras de DNA de alto peso molecular como se observa en la foto 1. En esta foto se presenta un gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de etidio, en el que se colocaron algunas muestras de DNA de la población andino ancashina, para determinar la calidad de DNA extraído, las bandas que corresponden al DNA de alto peso molecular, están ubicadas a la altura de los pozos en los que se sembró las muestras. Además, las diferentes intensidades de las bandas de cada muestra, significan una diferente concentración de DNA. En la tabla 4 se consignan las concentraciones y porcentajes de pureza de todas las muestras de DNA de la población en estudio, por ejemplo: la muestra 16anc presentó la concentración mas baja: 9.3 ng/ μ l y la muestra 29anc presentó la concentración mas alta: 219.6 ng/ μ l.

Condiciones y programa de amplificación:

- Las concentraciones óptimas de $MgCl_2$, primers y DNA molde para la PCR, fueron 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 picomoles de cada primer y 75 ng de DNA. La temperatura óptima de alineamiento fue $57.5^{\circ}C$ y el número de ciclos óptimo fue 27. Estas condiciones generaron una buena cantidad de producto amplificado específicos (alelos) y baja cantidad de productos inespecíficos, (Tabla 8 y Foto 2).

Tabla 8. Resultados obtenidos de la modificación del programa de amplificación. En esta tabla se muestra la intensidad correspondientes al producto amplificado específico e inespecífico.

Temperatura de Alineamiento	55°C		56°C		57.5°C	
	Producto amplificado		Producto amplificado		Producto amplificado	
Número de ciclos	Específicos (Alelos)	Inespecíficos	Específicos (Alelos)	Inespecíficos	Específicos (Alelos)	Inespecíficos
25	+	++	+	++	++	+
27	++	+++	++	+++	+++	+
30	+++	++++	+++	++++	++++	++
> 35	+++	++++	+++	++++	++++	++

Tabla 3. Datos de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina. En esta tabla se consignan los datos del lugar de nacimiento del individuo que conforma la población en estudio, sexo (M = Masculino y F = Femenino), edad, idioma o lengua de la familia y además el origen de los abuelos.

CODIGO	LUGAR DE NACIMIENTO	SEXO	EDAD	IDIOMA O LENGUA DE LA FAMILIA	ORIGEN DE ABUELOS	
					PATERNOS	MATERNOS
01anc	HUARAZ	M	51	CASTELLANO	OLLEROS	CARHUAZ
02anc	CABANA	F	32	CASTELLANO	CABANA	CABANA
03anc	LIMA	F	26	CASTELLANO	CABANA	CABANA
04anc	CABANA	M	29	CASTELLANO	CABANA	CABANA
05anc	HUARAZ	M	51	CASTELLANO	HUARAZ	HUARAZ
06anc	HUARAZ	M	26	CASTELLANO	HUARAZ	HUARAZ
07anc	HUARAZ	F	48	CASTELLANO	INDEPENDENCIA	INDEPENDENCIA
08anc	HUARAZ	F	38	CASTELLANO	INDEPENDENCIA	CHACAS CASMA**
09anc	SAN MARCOS	M	34	QUECHUA Y CASTELLANO	SAN MARCOS	SAN MARCOS
10anc	CHANCAY	M	33	CASTELLANO	CHACAS	CHACAS
11anc	PARIOCOTO	M	34	CASTELLANO	CARHUAZ	COCHABAMBA
12anc	SAN MARCOS	M	31	QUECHUA	SAN MARCOS	SAN MARCOS
13anc	HUARAZ	M	25	QUECHUA	HUARAZ	HUARAZ
14anc	HUACHO	M	26	QUECHUA	CHACAS	CHACAS
15anc	CHANCAY	M	41	QUECHUA Y CASTELLANO	CHACAS	CHACAS
16anc	HUARI	M	23	QUECHUA Y CASTELLANO	CHAVIN DE HUANTAR	CHACAS
17anc	CHANCAY	M	25	QUECHUA Y CASTELLANO	CHAVIN DE HUANTAR	CHAVIN DE HUANTAR
18anc	CHANCAY	M	30	QUECHUA Y CASTELLANO	INDEPENDENCIA	INDEPENDENCIA
19anc	HUARAZ	F	52	CASTELLANO	CARHUAZ INDEPENDENCIA	CORIS HUARAZ
20anc	LIMA	F	33	CASTELLANO	CASHAPAMPA	CASHAPAMPA
21anc	RECUAY	F	25	QUECHUA	HUAYAPAMPA	HUAYAPAMPA
22anc	MACATE	M	40	CASTELLANO	MACATE	MACATE
23anc	CORONGO	F	42	QUECHUA	LA PAMPA	LA PAMPA
24anc	PATIVILCA	F	41	QUECHUA	PISCOBAMBA	PISCOBAMBA
25anc	HUARAZ	M	38	CASTELLANO	AIJA	HUARAZ
26anc	CABANA	M	28	CASTELLANO	CABANA	CABANA
27anc	CABANA	M	87	CASTELLANO	CABANA	CABANA
28anc	CABANA	M	28	CASTELLANO	CABANA	CABANA
29anc	COTAPARACO	M	53	CASTELLANO	COTAPARACO	COTAPARACO
30anc	LIMA	M	28	CASTELLANO	CABANA	CABANA
31anc	LIMA	M	24	CASTELLANO	CABANA	CABANA
32anc	HUARI	M	49	CASTELLANO	HUACACHI	COLCABAMBA
33anc	LIMA	M	68	CASTELLANO	SAN MARCOS	SAN MARCOS

**Los bisabuelos maternos del individuo 08anc, son de la localidad de Chacas.

Tabla 4. Pureza y concentración de las muestras de DNA. En esta tabla se consigna las absorbancias a 260 y 280 nm, de las diluciones 1:10 de las muestras de DNA originales o reales de los individuos de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina. Además se consigna los valores de porcentaje de pureza (%), concentración de la dilución y concentración real u original de cada muestra de DNA.

Código	ABS 260	ABS 280	260/280	%	Dilución DNA ng/μl	Concentración real ng/μl
01anc	0.082	0.045	1.822	91.11	3.74	37.4
02anc	0.109	0.062	1.758	87.90	4.79	47.9
03anc	0.148	0.110	1.345	67.27	4.98	49.8
04anc	0.088	0.064	1.375	68.75	3.03	30.3
05anc	0.053	0.039	1.359	67.95	1.80	18.0
06anc	0.059	0.040	1.475	73.75	2.18	21.8
07anc	0.201	0.155	1.297	64.84	6.52	65.2
08anc	0.340	0.292	1.164	58.22	9.90	99.0
09anc	0.151	0.121	1.248	62.40	4.71	47.1
10anc	0.319	0.284	1.123	56.16	8.96	89.6
11anc	0.118	0.074	1.595	79.73	4.70	47.0
12anc	0.031	0.024	1.292	64.58	1.00	10.0
13anc	0.208	0.162	1.284	64.20	6.68	66.8
14anc	0.144	0.104	1.385	69.23	4.98	49.8
15anc	0.579	0.498	1.163	58.13	16.83	168.3
16anc	0.036	0.035	1.029	51.43	0.93	9.3
17anc	0.106	0.085	1.247	62.35	3.30	33.0
18anc	0.079	0.062	1.274	63.71	2.52	25.2
19anc	0.274	0.211	1.299	64.93	8.90	89.0
20anc	0.241	0.169	1.426	71.30	8.59	85.9
21anc	0.096	0.073	1.315	65.75	3.16	31.6
22anc	0.049	0.028	1.750	87.50	2.14	21.4
23anc	0.143	0.110	1.300	65.00	4.65	46.5
24anc	0.071	0.051	1.392	69.61	2.47	24.7
25anc	0.027	0.015	1.800	90.00	1.22	12.2
26anc	0.180	0.158	1.139	56.96	5.13	51.3
27anc	0.172	0.141	1.220	60.99	5.25	52.5
28anc	0.167	0.116	1.440	71.98	6.01	60.1
29anc	0.531	0.321	1.654	82.71	21.96	219.6
30anc	0.417	0.280	1.489	74.46	15.52	155.2
31anc	0.511	0.329	1.553	77.66	19.84	198.4
32anc	0.099	0.075	1.320	66.00	3.27	32.7
33anc	0.273	0.188	1.452	72.61	9.91	99.1

Marcador multialélico:

- El marcador multialélico construido constó de 5 alelos: 9, 10, 11, 12 y 13 como se observa en el gel de poliacrilamida (foto 3) y en el patrón de picos generado por el Analizador Genético ABI Prism 310. (foto 4). La identificación de los alelos de las muestras de DNA ancashino se consigna en los geles correspondientes a las fotos 5, 6 y 7.

Identificación de los alelos:

- Los alelos de cada muestra de los DNAs de la población de ascendencia andina ancashina se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Distribución de alelos D16S539 en la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina. Se indican los alelos presentes en cada uno de los 33 individuos pertenecientes a la muestra poblacional, por ejemplo se observa que el individuo 01anc, presenta los alelos 11 y 12; el 10anc presenta los alelos 9 y 12; el 28anc presenta los alelos 10 y 13.

CODIGO	ALELOS		CODIGO	ALELOS	
01anc	11	12	18anc	9	12
02anc	9	10	19anc	10	10
03anc	11	11	20anc	10	13
04anc	9	9	21anc	10	11
05anc	10	13	22anc	10	11
06anc	9	13	23anc	10	12
07anc	10	11	24anc	9	12
08anc	10	10	25anc	11	11
09anc	11	13	26anc	9	13
10anc	9	12	27anc	10	11
11anc	9	11	28anc	10	13
12anc	9	10	29anc	9	12
13anc	10	11	30anc	11	11
14anc	9	9	31anc	9	9
15anc	11	12	32anc	9	11
16anc	10	11	33anc	10	11
17anc	11	13			

Frecuencias alélicas y genotípicas, prueba de equilibrio genético y comparación de frecuencias alélicas:

- En la tabla 10 se indica las frecuencias alélicas y en la tabla 11 se detalla la distribución de las frecuencias genotípicas del STR D16S539, encontrándose 12 clases genotípicas que corresponden a la expresión de 5 alelos codominantes. Además estos valores de las frecuencias alélicas, genotípicas y algunos parámetros estadístico poblacionales forenses fueron generados usando el software PowerStats (Allan Tereba, 1999), Reporte 1.
- Las frecuencias genotípicas esperadas del STR D16S539, (Tabla 11), se obtuvieron elevando al cuadrado cada una de las frecuencias alélicas y multiplicándolas por el número de individuos de la población para los genotipos homocigotos.

Tabla 10. Frecuencias alélicas del D16S539 de la población en estudio.

Alelos	Ancash
9	0.242
10	0.258
11	0.288
12	0.106
13	0.106

Por ejemplo en el caso del genotipo 9/9, se elevó al cuadrado su frecuencia (0.242) y el producto se multiplicó por $n = 33$, dando una frecuencia genotípica de 1.94. Para el caso de los genotipos heterocigotos, se multiplicó el número de individuos de la población por el doble producto de la frecuencia de cada uno de los alelos. Por ejemplo en el caso de la frecuencia esperada para el genotipo 11/13, se multiplicó $33 \times 2 \times 0.288 \times 0.106$, dando una frecuencia de 2.02. Después de comparar las frecuencias esperadas con las observadas, usando la prueba de Chi Cuadrado, para determinar si la muestra poblacional se encuentra en equilibrio genético se obtuvieron los valores $\chi^2 = 9.912$, para 10 grados de libertad (son

el resultado de restar al número de genotipos el número de alelos) se obtuvo un valor de probabilidad de 0.448248 el cual no es significativo, a un nivel de significancia de 0.05. Se observó un porcentaje de heterocigosidad de 75.8 %.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas del STR D16S539.

La tabla muestra el número de individuos por genotipo observado y esperado de la población de ascendencia andina ancashina n = 33 individuos.

Genotipo	Individuos observados	Individuos esperados
9 / 9	3	1.94
9 / 10	2	4.12
9 / 11	2	4.61
9 / 12	4	1.70
9 / 13	2	1.70
10 / 10	2	2.19
10 / 11	7	4.89
10 / 12	1	1.80
10 / 13	3	1.80
11 / 11	3	2.73
11 / 12	2	2.02
11 / 13	2	2.02
12 / 12	0	0.37
12 / 13	0	0.74
13 / 13	0	0.37

- Al realizar la prueba exacta de diferenciación poblacional (Exact Test of populations differentiation) basada en el estadístico F_{st} (Fisher stadistic), entre las frecuencias alélicas de las poblaciones ancashina e hispanoamericana empleando el software Arlequín (Stefan y col. 2000), se obtuvo un valor de $p=0.07279 \pm 0.0016$ a un nivel de significancia de 0.05, que nos indica que no existe diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de ambas poblaciones.
- Al usar el software GDA (Lewis, 2001) para realizar la prueba exacta de equilibrio genético poblacional se obtuvo un valor de probabilidad de 0.4365 (análisis Chi Cuadrado) y 0.5175 (análisis de Fisher), Reporte 2.

DISCUSION

- Para este trabajo se escogió el STR D16S539 ubicado en el cromosoma 16, en la región 16q22 – 24, debido a que presenta 9 alelos ampliamente distribuidos en la población mundial, de los cuales se han reportado 7 para la población hispanoamericana: 8, 9, 10, 12, 13, 14 y 15 (Steven, 1998), además este STR es muy usado en los estudios de identificación humana, conjuntamente con otros microsatélites.
- Las muestras de DNA genómico de la población de ascendencia andina ancashina, presentaron diferentes concentraciones de DNA y valores distintos de porcentaje de pureza. Estos parámetros distintos no afectaron la amplificación de los alelos del D16S539, (Foto 1 y Tabla 4). De las observaciones de los fragmentos amplificados usando los programas de amplificación con variación de concentración de DNA, se determinó que es mejor usar menor cantidad de DNA molde para evitar la presencia de productos inespecíficos. De la misma forma mientras mas concentración de primers por reacción, aumentan los fragmentos inespecíficos.
- La prueba exacta de diferenciación poblacional usada evalúa la hipótesis de que cierto número de alelos diferentes están distribuidos aleatoriamente y esta distribución alélica es idéntica entre las poblaciones analizadas, es decir, no existen diferencias a nivel genético entre las poblaciones (Reymond y Rousset, 1995). El valor de la prueba de Fst es obtenido empleando la varianza de las frecuencias alélicas de las poblaciones, dividido entre el promedio de las frecuencias alélicas por uno, menos el promedio de las frecuencias alélicas (Guido Barbujani, 2000). El software Arlequin genera un valor de Fst corregido, es decir más cercano a lo que ocurre en poblaciones naturales, empleando el algoritmo matemático de las Cadenas de Markov. El resultado obtenido del valor de $p = 0.07279 \pm 0.0016$, empleando el software Arlequín (Stefan y col. 2000), al no ser significativo se acepta la

hipótesis, por consiguiente, no existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas del D16S539 entre las poblaciones: hispanoamericana y ancashina.

- Al realizar la comparación de los alelos presentes en las poblaciones: hispanoamericana y ancashina se observa que la segunda no cuenta con los alelos 8 y 14 (Gráfico 1), a pesar de esto no hay diferencias significativas al aplicar la prueba de Fst, ya que la presencia de estos alelos en la población hispanoamericana se encuentra en muy baja frecuencia.
- La población de ascendencia andina ancashina no presenta los alelos 5, 8, 14 y 15, el alelo 5 se encuentra en la población afroamericana como la de Río de Janeiro en Brasil (Barrios de Castro y col., 2000) y el alelo 15 en la población caucásicoamericana como la población caucásica mestiza de Bogotá en Colombia (Bravo y col., 2001). Los alelos 8 y 14 se encuentran en baja frecuencia en la población afroamericana y caucásicoamericana, siendo más escaso en la hispanoamericana (Steven y col., 1998).
- La población de ascendencia andina ancashina presenta una distribución unimodal de sus frecuencias alélicas del D16S539 al igual que la hispanoamericana, teniendo ambas poblaciones las frecuencias alélicas más altas a nivel del alelo 11. A diferencia de las poblaciones caucásicoamericana y afroamericana que presentan distribución bimodal de sus frecuencias alélicas del D16S539, teniendo las frecuencias alélicas más altas a nivel de los alelos 9 y 11 (Steven y col., 1998).
- Analizando las proporciones genotípicas esperadas para la población de ascendencia andina ancashina en el equilibrio genético de este marcador, se observa una baja frecuencia de los alelos 12 y 13, y además una alta frecuencia de la combinación fenotípica 10 / 11. Después de realizar la prueba de Chi cuadrado (χ^2), se determina que la población está en equilibrio al no existir diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas esperadas y observadas. El mismo resultado de equilibrio fue obtenido usando la prueba exacta de Fisher, que es más adecuada para muestras poblacionales de un número pequeño mayor a

30, con distribución normal, (Carracedo y Barros, 1996).

- El porcentaje de heterocigosidad observado en la población estudiada para el D16S539 es superior al 70 %, comportándose igual que la mayoría de las poblaciones mundiales, (Cabrera y col., 1995; Edwards y col., 1991b).
- Finalmente, las frecuencias para la población hispanoamericana para el D16S539 pueden ser empleadas en los análisis de paternidad de individuos de ascendencia andino ancashina, debido a la inexistencia de diferencias significativas entre las frecuencias de ambas poblaciones.

CONCLUSIONES

- La metodología estandarizada para el procedimiento y análisis de las muestras de DNA de la población en estudio resultó ser adecuada para la identificación satisfactoria de los alelos del microsatélite tetranucleotídico D16S539.
- La población en estudio de ascendencia andina ancashina presenta 5 alelos de los 9 reportados para los diferentes grupos poblacionales mundiales.
- Las frecuencias genotípicas del microsatélite D16S539 de la población estudiada se encontró en equilibrio genético después de realizar análisis del Chi cuadrado.
- Se concluye que no existe diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de la población estudiada e hispanoamericana, lo que nos indica que hay una alta correlación entre ambas poblaciones a nivel del microsatélite D16S539.
- De la conclusión anterior se infiere el rechazo de la hipótesis nula: “Existe diferencias significativas entre las frecuencias alélicas del marcador D16S539 reportadas para la población hispanoamericana y las frecuencias alélicas de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina” y la aceptación de la hipótesis alterna: “No, existe diferencias significativas entre las frecuencias alélicas del marcador D16S539 reportadas para la población hispanoamericana y las frecuencias alélicas de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina”.
- Finalmente se determina que las frecuencias alélicas de la población hispanoamericana para el D16S539, pueden ser empleadas en los análisis de paternidad de individuos de ascendencia andina ancashina, debido a la inexistencia de diferencias significativas entre las frecuencias de ambas poblaciones.



SUGERENCIAS

- Esta metodología puede ser empleada en el estudio de otros microsatélites tetranucleotídicos tanto en humanos como en cualquier otro organismo, ya que la estructura, las propiedades y la composición del DNA son las mismas en todos los organismos.
- Sería conveniente hacer un estudio de las frecuencias alélicas en diferentes grupos poblacionales peruanos, no solo para este marcador sino para los cerca de 20 microsatélites involucrados en estudios de tipificación humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alford, R., Ambmond, H., Coto, I. Rapid and Efficient Resolution of Parentage by Amplification of Short Tandem Repeats. *Am J Hum Genet* 1994; 55 (1): 190-195.
- Allan Tereba. Tools for Analysis of Population Statistics. *Profiles in DNA – Promega*. 1999; 2 (3): 14 –16.
- Barrios de Castro, L.A., Rinzler, C.M.C., Rumjanek, F.D. Allele Frequency Distributions for Twelve STR Loci in a Brazilian Population. *J. Forensic Sci.* 2000; 45: 941
- Barton, E. & Albrigh, L. DNA sequencing. *Current Protocols in Molecular Biology* Massachusetts General Hospital & Harvard Medical School, 1994; I, 7.6.1-7.6.13.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P.M. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem* 1991; 196, 80.
- Benson, D.A., Boguski, M.A., Lipman, D.J., Ostell, J., Quellerie, B.F.F., Rapp, B.A., Wheeler, D.L. GenBank. *Nucleic Acids Research* 1999; 27 (1): 12 – 17.
- Bravo, M.L., Moreno, M.A., Builes, J.J., Salas, A., Lareu, M.V., Carracedo, A. (2001) Autosomal STR genetic variation in negroid Chocó and Bogotá populations. *Int. J. Legal Med.* 115: 102 – 104.
- Cabrera, C.; Díez, A. Valverde, E.: Allele frequency distribution of four PCR-Amplified loci in the Spanish population. *Foren Sci International* 1995; 71: 153-164.
- Carracedo, A. y Barros, F. Problemas Bioestadísticos en Genética Forense. Universidad de Santiago de Compostela, 1996. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur. pp 11 – 53.
- Edwards, A. y col.. “DNA Typing with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats: polymorphic loci, detection Systems, and Population Genetics,” In: *The Second International Symposium on human Identification*, Promega Corporation 1991a; 31.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A. and Casey, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet* 1991b; 49, 746 – 756.
- Guido Barbujani. Geographic Patterns: How to Identify Them and Why?. *Human Biology* 2000; 72: 133 – 153.
- Hagelberg, E., Gray, I. & Jeffreys, A.J. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 1991; 352: 427 – 429.
- Jeffreys, A.J., Wilson V., Thein, S.L. Hypervariable “Minisatellite” regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67 – 72.
- Lewis, PO and Zaykin, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of

allelic data. Version 1.0 (d16c). 2001. Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>

- Marmur, J.. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208 - 218.
- Martín de las Heras S., Valenzuela A., Villanueva E., Marques T., Exposito N., Bohoyo J. M. Methods for identification of 28 burn victims following a 1996 bus accident in Spain. *J. Forensic Sci.* 1999; 44(2): 428 – 431.
- Murray, J., Sheffield, V, Weber, J. L., Duyk, G. and Buetow, K. H. human STS CHLC.GATA11C06.P6766 clone GATA11C06, sequence tagged site. Cooperative Human Linkage Center. Unpublished 1995. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=938475&dopt=GenBank
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'connell, P., Wolff, R., Holm. T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kum Lin, E., White, R. Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping, *Science* 1987; 235: 1616-1622.
- Pena, S.D.J., Chakraborty, R. Paternity testing in the DNA era. *TIG* 1994; 10: 204 – 209.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995: An exact test for population differentiation. *Evolution* 1995; 49: 1280 –1283.
- Ruitberg, C.M., Reder D.J., Butler, J.M. STR Base: a short tandem repeat DNA database for the humana identity testing community. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 320 – 322.
- Ruiz García, M & J. Jordana. Spatial structure and determination of gene flow of allozyme blood characteristics in the Pyrenean Brown breed, a rare cattle breed, in Catalonia, Spain. *Biochemical Genetics* 2000; 78: 313-319
- Saiki, R.K. , Scharf, F., Faloona, F., Mullis, K.B. , Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genome sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
- Stefan Schneider, David Roessli, and Laurent Excoffier. Arlequín ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.
- Steven, D.C., Robert, A.B., Cynthia, J.S. & James, W.S. Population Data. GenePrint™ Systems(Silver Stain Detection). Technical Manual, Promega, 1998; C: 48 – 50.
- Strauss, W. Preparation and analysis of DNA. *Current Protocols in Molecular Biology* Massachusetts General Hospital & Harvard Medical School, 1994; I, 2.2.1-2.2.3.
- Tito, T. R., Lizárraga, B. Polimorfismo del Marcador STR D16S539 en una Muestra de la Población Mestiza Peruana. II Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Noviembre del 2001, pp 52.
- Weber, J.L., May, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum, Genet.* 1989; 44: 388 – 396.



Estimación de las Frecuencias Alélicas del D16S539 en una Muestra Poblacional de ascendencia andina ancashina. Tito Tadeo, Raúl Yhossef.

Derechos reservados conforme a Ley

- **http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_d16s.htm**
- **http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=9256450&dopt=GenBank**

ANEXOS

- Comparación de las Frecuencias alelicas entre las muestras poblacionales andino ancashina e hispanoamericana.
- Reporte 1.
- Reporte 2.
- Mapa 1.
- Afiche de Campaña de Salud.
- Consentimiento para participar en la investigación del proyecto y Ficha de datos.

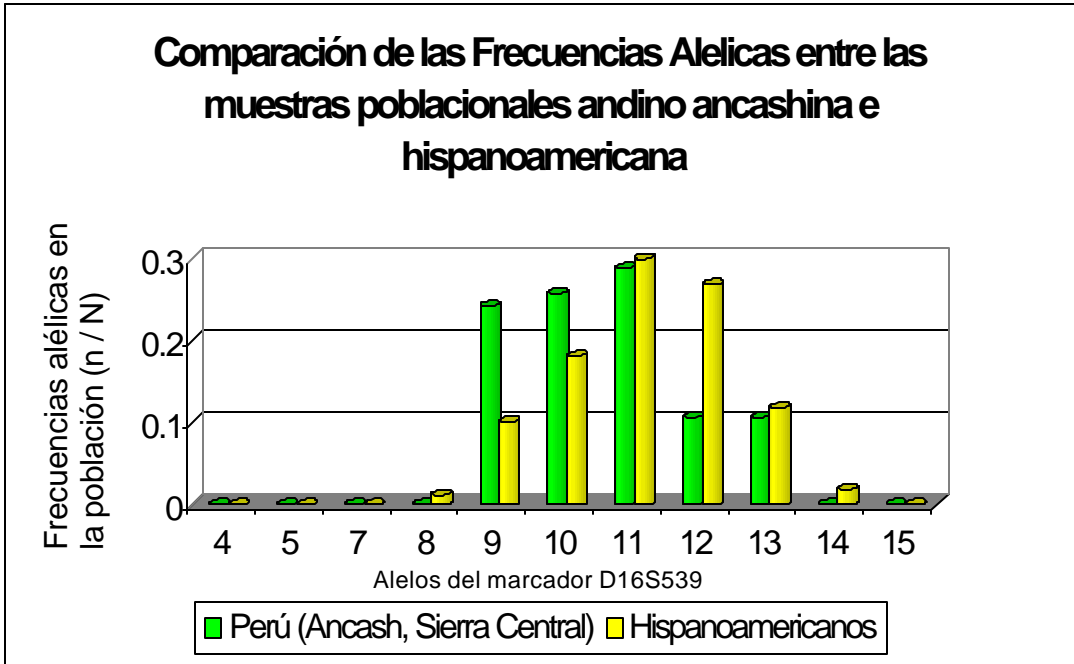


Gráfico 1. Distribución de frecuencias de los alelos del STR D16S539 en las muestras poblacional de ascendencia andino ancashina (barras oscuras) e hispanoamericana (barras claras). La frecuencia alélica es el cociente obtenido a partir del número de un alelo específico (n) dividido entre el total de alelos de la población (N). Las frecuencias alélicas provienen de la tabla 2 (hispanoamericanos) y tabla 9 (ancashinos). En ambas poblaciones se observa en similar frecuencia el alelo 11 (0.288, 0.300), además de ser el de mayor frecuencia entre todos los alelos. La frecuencia alélica del alelo 13 (0.106, 0.118) es similar en ambas poblaciones, la frecuencia del alelo 9 (0.242, 0.101) y 10 (0.258, 0.181) de la muestra poblacional de ascendencia andina ancashina (MPAA) es casi el doble de la hispanoamericana, la frecuencia del alelo 12 (0.106, 0.268) de la MPAA es poco menos de la mitad de la hispanoamericana. La MPAA no presenta los alelos 8 (0.012) y 14 (0.019), que en la muestra de la población hispanoamericana se encuentran en muy baja frecuencia.

REPORTE 1

1 de 1

PowerStats (Allan Tereba, 1999)

Locus:	D16S539	1
		ANCASH
Forense		
Probabilidad de coincidencia		0.1074380 2
	Expresado como 1 en ...	9.3076923 1
Poder de discriminación		0.8925619 8
PIC		0.7313659 6
Paternidad		
Probabilidad de exclusión		0.5228163 9
Indice de paternidad típico		2.0625
Homocigotos		0.2424242 4
Heterocigotos		0.7575757 6
	Alelos totales	66
	Frecuencias alélicas	
	Alelo	Frecuencia
	9	0.2424242 4
	10	0.2575757 6
	11	0.2878787 9
	12	0.1060606 1
	13	0.1060606 1

REPORTE 1

PowerStats (Allan Tereba, 1999)

Locus: **D16S539**
Frecuencia

Total	33								
Homo	8	0.24242424							
Hetero	25	0.75757576							
Frecuencia			Alelo	9	10	11	12	13	
0.24242424	16		9	3					
0.25757576	17		10	2	2				
0.28787879	19		11	2	7	3			
0.10606061	7		12	4	1	2	0		
0.10606061	7		13	2	3	2	0	0	

D16S539							Frecuencia Mínima
	N	He Obs.	FI	2N-1	c	Suma	
Ancash	33	0.7576	3.13	65	10.134	3.243	0.07700475

Genetic Data Analysis GDA (Lewis, 2001)

Logging to file C:\GDA\ancash1.TXT

Opening the NEXUS data file C:\GDA\ancash.nex

Sample data set on p. 338-339 of Weir, B. S. 1990. Genetic Data Analysis. Sinauer, Sunderland, Mass.

Data matrix has 1 populations, 1 locus, and 33 individuals
 Missing data represented by the symbol ?
 Different genes at one locus separated by the symbol /
 Multicharacter allele names.
 Labels provided for individuals.
 Respecting case for allele names.
 Data matrix not interleaved.
 All loci are diploid.

Descriptive statistics for locus: locus 1

Population	n	P	A	Ap
Pop 1	33	1	5	5
Mean	33.000000	1.000000	5.000000	5.000000

Population	He	Ho	f
Pop 1	0.781352	0.757576	0.030890
Mean	0.781352	0.757576	0.030890

Private alleles (defined by set of populations currently active):

Locus	Allele	Frequency	Found in
locus 1	13	0.106061	Pop 1
locus 1	9	0.242424	Pop 1
locus 1	10	0.257576	Pop 1
locus 1	11	0.287879	Pop 1

Genetic Data Analysis GDA (Lewis, 2001)

Exact test options:

NRUns = 2000
 Subsets = yes
 Onlyhets = no
 MEasure = FISHER
 MIssings = DISCARD
 Upto = 1
 Permute =

Exact tests for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium:

Subsets of loci will be analyzed
 Subsets will be comprised of up to 1 loci
 Individuals with missing data will be discarded
 Number of runs: 2000
 Measure: Fisher
 Shufflings will break up genotypes for all loci

Population # 1 (Pop 1) of 33 individuals

Runs	Prob	Locus combination
2000	0.517500	locus 1

Exact tests for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium:

Subsets of loci will be analyzed
 Subsets will be comprised of up to 1 loci
 Individuals with missing data will be discarded
 Number of runs: 2000
 Measure: Chi-square
 Permute methods string: b

Population # 1 (Pop 1) of 33 individuals

Runs	Prob	Locus combination
2000	0.436500	locus 1

FOTOS DE CORRIDAS ELECTROFORETICAS

Lista de fotos:

Foto 1. Calidad del DNA de las muestras de ascendencia andina ancashina.

Foto 2. Amplificación de las muestras de DNA de la población de ascendencia andina ancashina.

Foto 3. Electroforesis del marcador multialélico obtenido a partir de las mezclas de DNA.

Foto 4. Verificación del tamaño de los componentes del marcador multialélico por electroforesis capilar del amplificado de la mezcla de DNA.

Foto 5. Identificación de los alelos del D16S539 presentes en los individuos de la población de ascendencia andina ancashina.

Foto 6. Identificación de los alelos del D16S539 presentes en los individuos de la población de ascendencia andina ancashina.

Foto 7. Segregación o patrón de herencia de los alelos del D16S539.

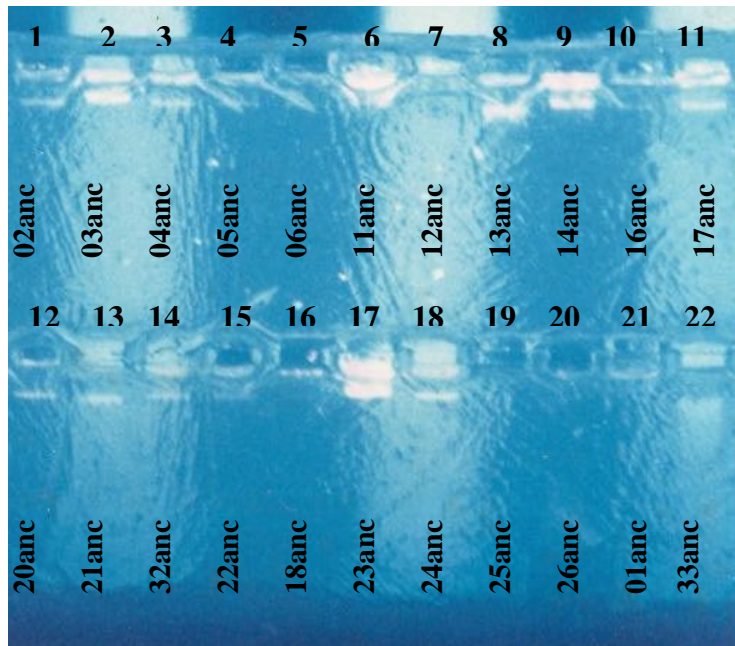


Foto 1. **Calidad del DNA de las muestras de ascendencia andina ancashina.** En el gel de agarosa al 2% TBE 1X, corrido a 100 voltios constantes durante 37 minutos, teñido con bromuro de etidio se observan bandas correspondientes a las muestras de DNA de la población en estudio. Las bandas presentes, una a la altura del pozo y la otra mas abajo, corresponden a DNA de alto peso molecular, debido a su escasa migración. El DNA no presenta bandas difusas en forma de escalera (chorreado), lo que indica que no está degradado. Los carriles 2, 6, 8, 9, 11, 17, 18 y 22 presentan bandas muy intensas, lo que nos indica elevada concentración de DNA. En los carriles 19 y 20 no se observan bandas, debido a que las muestras de DNA están muy diluidas, esto se debe a la poca concentración de DNA en dichas muestras.

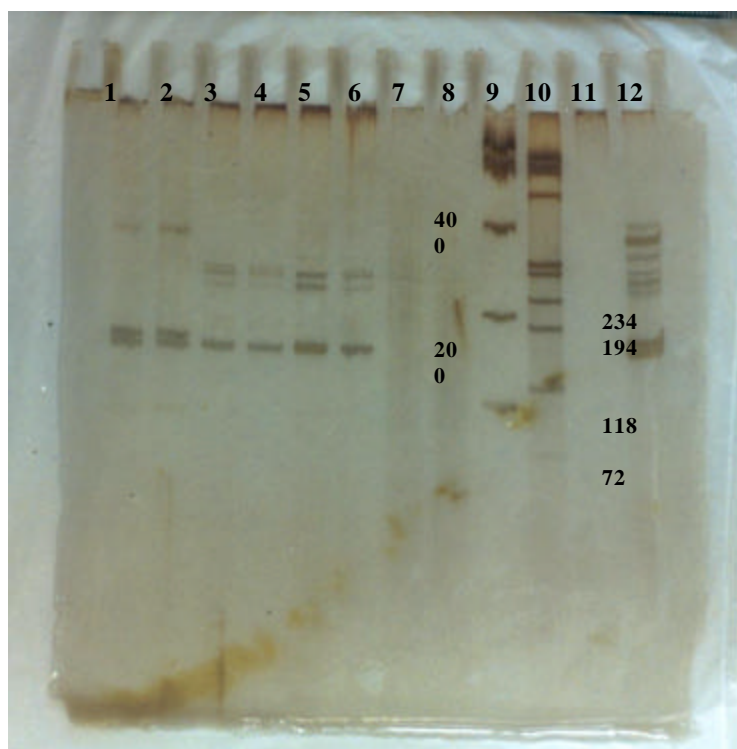


Foto 2. **Amplificación de las muestras de DNA de la población de ascendencia andina ancashina.** El tamaño esperado de los alelos del D16S539 amplificados, con los primers que se detallan en materiales y métodos, deben estar dentro del rango de 133 a 173 pares de bases, lo cual coincide con las muestras analizadas en los carriles del 1 al 6 del gel de poliacrilamida al 8 % en una corrida con buffer TBE 1X a voltaje constante. Se utilizó dos marcadores estándar de tamaño de fragmentos de DNA, uno de ellos es el Low Mass DNA ladder (Life Technologies) que es una mezcla de oligonucleótidos de extremo romo de 100, 200, 400, 800, 1200 y 2000 pares de bases. El otro marcador utilizado es el phi-X 174 cortado con Hae III (BioLabs) con bandas de 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078 y 1353 pares de bases. Como se observa en este gel, el amplificado obtenido con los primers para el STR D16S539 se ubica entre las bandas de 118 a 194 pares de bases. Las otras bandas entre 200 y 400 pares de bases son productos inespecíficos, en el carril 12 se observa gran cantidad de éstos, generados por un exceso de ciclos durante la amplificación, más de 43 ciclos.

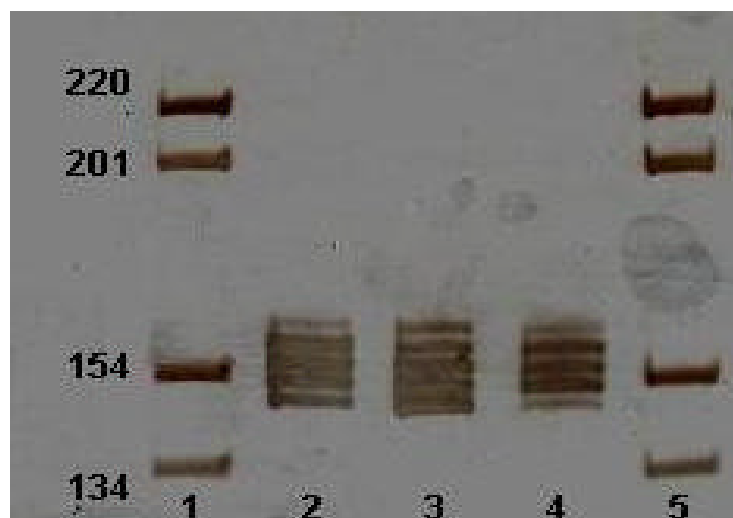


Foto 3. **Electroforesis del marcador multialélico obtenido a partir de las mezclas de DNA.** En la foto se presenta un gel de poliacrilamida al 8% 7M urea corrido en buffer TBE 1X a voltaje constante, donde se aprecia las bandas obtenidas al amplificar o someter a PCR a 3 de las 4 mezclas equimolares de DNA obtenidas de diferentes individuos. En el carril 1 y 5 se observan bandas pertenecientes a los fragmentos de 134, 154, 201 y 220 bases del marcador estándar comercial de número de bases de fragmentos de DNA 1 Kb Ladder, Life Technologies. En los carriles 2, 3 y 4 se observan las bandas generadas después de amplificar con los primers para el D16S539 las 3 mezclas de DNA. Cada una de las mezclas ha generado 5 bandas que están entre 134 y 201 bases, cada una de estas bandas corresponde a un alelo del marcador D16S539. De acuerdo al número de bases podemos identificar a los alelos (tabla 1), el alelo 5 de 133 pares de bases es el más pequeño y el más grande es el alelo 15 de 173 pares de bases. Comparando la distancia migrada de las bandas o alelos de las mezclas con la migrada por fragmentos de tamaño de bases conocidas del estándar comercial, se determinó que alelos estaban presentes en la mezcla, el alelo 10 de 153 pares de bases se identificó usando la banda o fragmento de 154 pares de bases del estándar comercial, el fragmento de 153 bases estaría por debajo del de 154 bases ya que se retarda durante la migración electroforética. Los alelos presentes en las mezclas son 9, 10 11, 12 y 13. Las mezclas de los carriles 2 y 3 contienen en igual intensidad los 5 alelos.

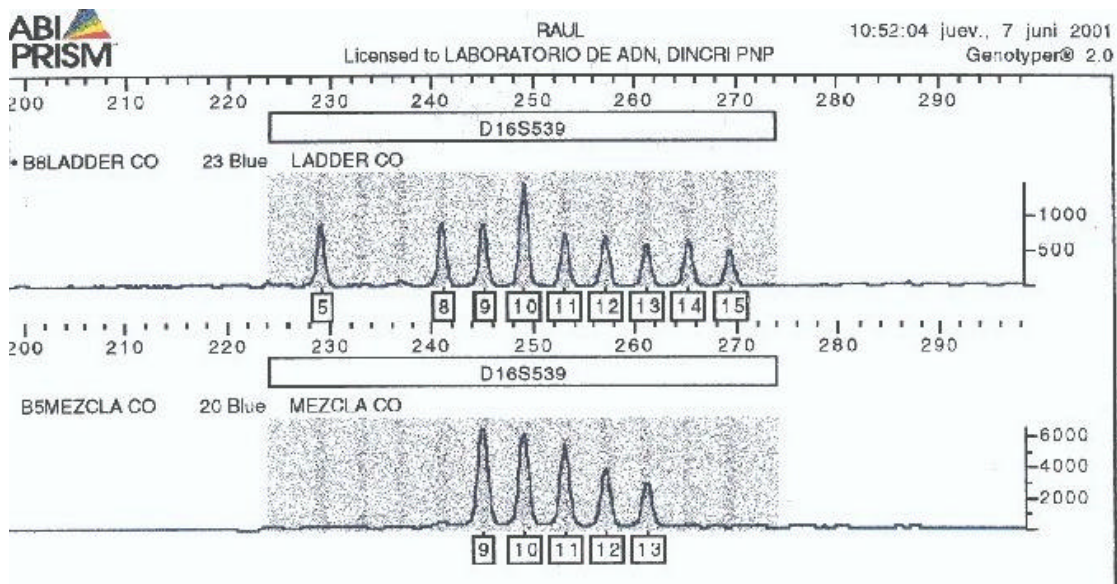


Foto 4. **Verificación del tamaño de los componentes del marcador multialélico por electroforesis capilar del amplificado de la mezcla de DNA.** En el registro se observan unos picos, que corresponde a una electroforesis capilar procesada por un analizador genético (ABI Prism 310, Genetic Analyzer), que detecta los fragmentos de DNA (marcados en un extremo con un fluorocromo) por medio de un sistema de láser y celda fotosensible. Este sistema cuenta con una estándar comercial para los 9 alelos del microsatélite. Al someter los fragmentos amplificados de la mezcla de DNA (usando primers del D16S539 marcados con fluorocromos) a este sistema se obtuvo 5 picos, el primer pico corresponde al alelo 9, y los siguientes al 10, 11, 12 y 13 lo que confirmó los resultados obtenidos en el gel de poliacrilamida de la foto 3. Con los primers D16S539 marcados con fluorocromos se obtienen alelos más grandes (debido a que flanquean más alejadamente la región del microsatélite D16S539, encontrándose los alelos entre 228 y 270 bases) que los obtenidos usando los primers del CHLC, empleados para la amplificación de las mezclas de DNA de los carriles 2, 3 y 4 del gel de poliacrilamida de la foto 3 y todas las muestras de DNA de la población de ascendencia ancashina. Esta prueba fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Policía Nacional

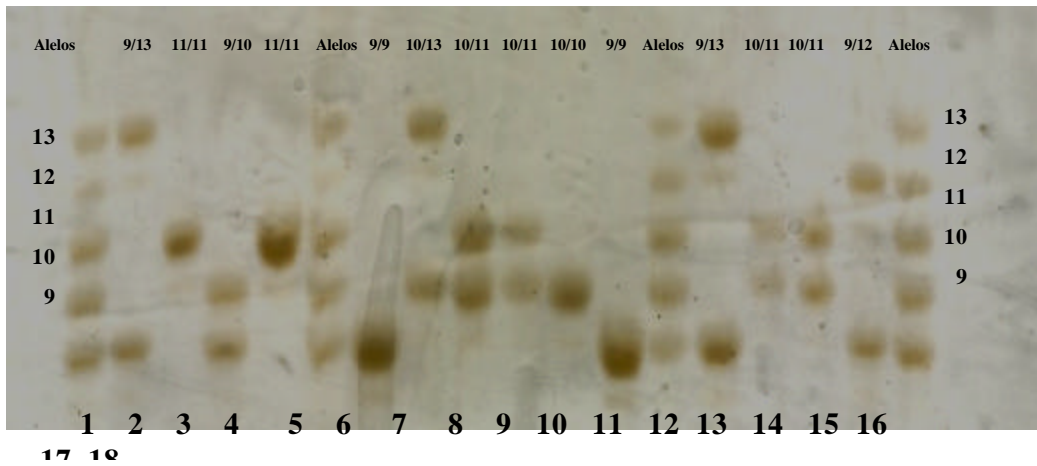


Foto 5. **Identificación de los alelos del D16S539 presentes en los individuos de la población de ascendencia andina ancashina.** Se observa un gel de poliacrilamida al 8% 7 M urea, donde se encuentran los alelos del D16S539 después de amplificar las muestras de DNA de cada individuo. En el carril 1, 6, 13 y 18 se observa el marcador multialélico que consta de 5 alelos: alelo 9 que contiene 9 repeticiones GATA como se indica en la tabla 1, alelo 10 que contiene 10 repeticiones GATA, alelo 11 que contiene 11 repeticiones GATA, alelo 12 que contiene 12 repeticiones GATA y alelo 13 que contiene 13 repeticiones GATA. En el carril 2: 06anc presenta los alelos 9/13, carril 3: 25anc 11/11, carril 4: 02anc 9/10, carril 5: 03anc 11/11, carril 7: 04anc 9/9, carril 8: 05anc 10/13, carril 09: 07anc 10/11, 1 carril 10: 16anc 10/11, carril 11: 19anc 10/10, carril 12: 31anc 9/9, carril 14: 26anc 9/13, carril 15: 27anc 10/11, carril 16: 22anc 10/11 y carril 17: 10anc 9/12.

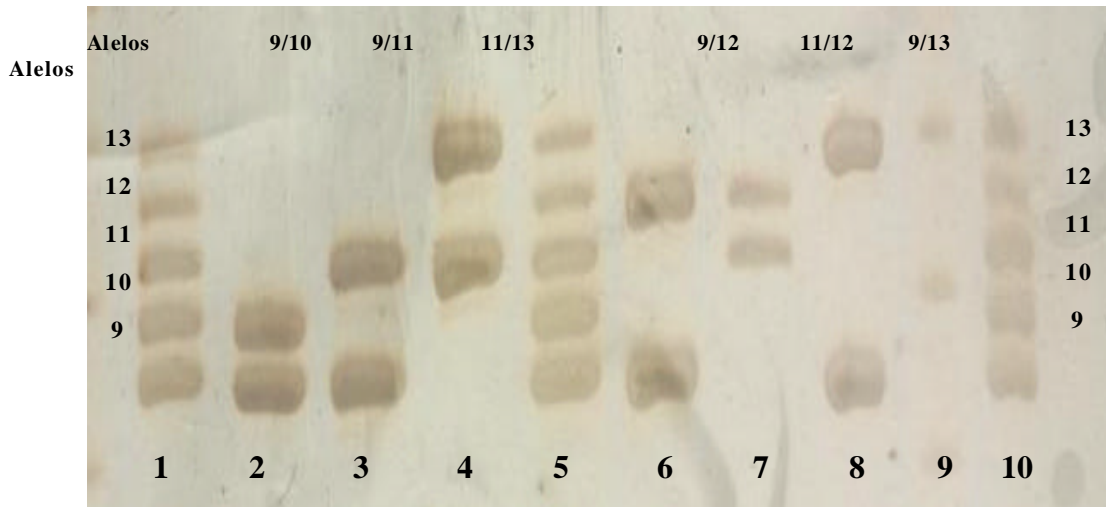


Foto 6. **Identificación de los alelos del D16S539 presentes en los individuos de la población de ascendencia andina ancashina.** Gel de poliacrilamida al 8% 7 M urea, se observan los alelos del D16S539 después de amplificar las muestras de DNA de cada individuo. En el carril 1, 5 y 10 se observa el marcador multialélico, carril 2: 02anc 9/10, carril 3: 11anc 9/11, carril 4: 17anc 11/13, carril 6: 24anc 9/12, carril 7: 01anc 11/12, carril 8: 26anc 9/13 y carril 9: marcador de 10 pares de bases.

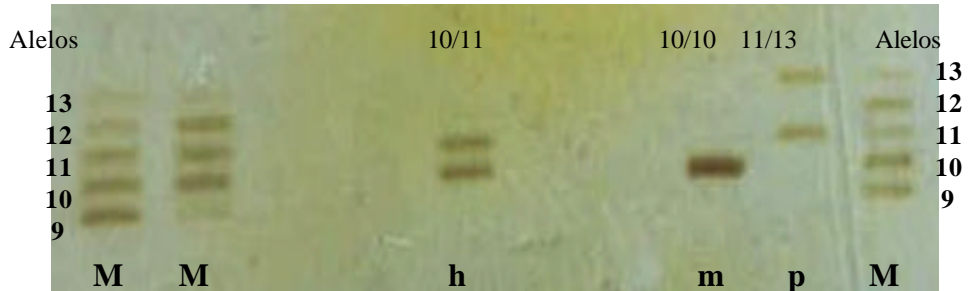


Foto 7. **Segregación o patrón de herencia de los alelos del D16S539.** En el gel de poliacrilamida se observa el marcador multialélico en los carriles **M**, en el carril **h** se observa una muestra de DNA de un individuo que presenta los alelos 10 y 11, en el carril **m** se observa una muestra de DNA de un individuo que presenta los alelos 10 y 10 y en el carril **p** se observa una muestra de DNA de un individuo que presenta los alelos 11 y 13. la relación de parentesco es la siguiente: los alelos del carril **h** corresponde al hijo de las muestras de los carriles **m** y **p**. El hijo hereda el alelo 10 de la madre y el 11 del padre como se observa en el gel.