CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE DIEZ MARCADORES STRs DEL CROMOSOMA X EN UNA MUESTRA DE INDIVIDUOS DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER

ADRIANA LUCÍA PICO ROMERO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE DIEZ MARCADORES STRs DEL CROMOSOMA X EN UNA MUESTRA DE INDIVIDUOS DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER

ADRIANA LUCÍA PICO ROMERO

Trabajo de grado para optar al título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora
Dra. ADRIANA CASTILLO PICO
Bact. MsC

Asesora
Dra. LEONOR GUSMAO
Biologa PhD.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007

A mi esposo Javier, tu ternura, paciencia y comprensión, me dieron la fuerza para enfrentar y culminar este nuevo reto en mi vida. Tú, compartiste mis alegrías y fuiste un gran apoyo en esos momentos de crisis y cansancio. Gracias por estar con migo en esta ardua pero maravillosa experiencia.

Para ti, mi eterno amor y agradecimiento.

Adriana L.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme todo lo que tengo, por ser mi fortaleza y no dejarme caer nunca.

A mi mamá y mi papá por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente, gracias porque sin ellos y sus enseñanzas no estaría aquí ni sería quien soy ahora.

A la doctora ADRIANA CASTILLO PICO por asesorarme a lo largo de la tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente proyecto, por compartir su conocimiento conmigo.

A la doctora LEONOR GUSMAO por asesorarme y ayudarme a lo largo de la tesis de una manera tan desinteresada.

A mis amigas del laboratorio, Adriana María y Olguita quienes con su apoyo no dejaron que desfalleciera en esos momentos difíciles.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. OBJETIVOS	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1..2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 REGIONES MICROSATELITES DEL GENOMA HUMANO	20
2.1.1 STRs del cromosoma X	21
2.1.1.1 Ligamiento entre marcadores del cromosoma X	22
2.1.1.2 Aplicaciones de los microsatélites del cromosoma X	23
2.1.1.2.1 Construcción de mapas genéticos y estudios de enfermedad	23
2.1.1.2.2 Pruebas de filiación	24
2.1.1.2.3 Identificación Humana	26
2.1.1.2.4 Estudios de genética poblacional	27
2.2 VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES	28
2.2.1 Equilibrio de Hardy Weinberg	28
2.2.2 Fuerzas evolutivas	29
2.2.2.1 Mutación	29
2.2.2.1.1 Tasa de mutación	30
2.2.2.2 Selección	31

Pág.

2.2.2.3 Migración 31

2.2.2.4 Deriva genética 31

2.3 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN 32

2.4 PARÁMETROS FORENSES 33

2.4.1 Poder de discriminación 33

2.4.2 Probabilidad de coincidencia 34

2.4.3 Heterocigosidad 34

2.4.4 Poder de exclusión 34

2.5 BASE DE DATOS POBLACIONALES 35

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 37

4. MATERIALES Y MÉTODO 38

4.1 MUESTREO 38

4.1.1 Individuos no relacionados 38

4.1.2 Individuos relacionados: grupo familiar 38

4.1.2.1 Criterios de exclusión 38

4.1.3 Datos de los individuos 38

4.1.4 Aspectos éticos 39

4.2 PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO 40

4.2.1 Toma de la muestra 40

4.2.2 Extracción del ADN 40

4.2.3 Genotipificación 40

4.2.3.1 Selección de los loci 40

Pág.

4.2.3.2 Amplificación 42

4.2.3.3 Electroforesis capilar 43

4.2.3.4 Asignación alélica 44

4.2.4 Secuenciación 44

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 45

4.3.1 Cálculo de las frecuencias genotípicas 45

4.3.2 Cálculo de frecuencias alélicas 45

4.3.3 Test de equilibrio de Hardy Weinberg 45

4.3.4 Test de desequilibrio de ligamiento 45

4.3.5 Parámetros de interés forense 45

4.3.6 Comparación de las frecuencias alélicas de los marcadores STRs del cromosoma X entre la población santandereana y otras poblaciones 46

4.4 TASA DE MUTACIÓN 46

4.4.1 Identificación de exclusiones 46

4.4.2 Cálculo de tasa de mutación 46

5. RESULTADOS 47

5.1 ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS DEFINITIVA 47

5.2 FRECUENCIAS GENOTIPICAS 48

5.3 FRECUENCIAS ALÉLICAS 53

5.4 EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG 56

5.5 ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO 56

5.6 PARÁMETROS DE EFICIENCIA FORENSE 57

Pág.

5.7 COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN ALELICA DE LOS MARCADORES STRs DEL CROMOSOMA X EN SANTANDER CON OTRAS POBLACIONES 59

5.8 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN 61

5.9 SECUENCIACIÓN 62

6. DISCUSIÓN 68

6.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA 68

6.2 EFICIENCIA FORENSE DE LOS MARCADORES 71

6.3 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA 72

6.4 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN 73

7. CONCLUSIONES 75

8. RECOMENDACIONES 76

BIBLIOGRAFÍA 77

ANEXOS 84

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Interpretación de los valores para FS_T 33

Tabla 2. Secuencia y referencia de los primers, y su marcaje 43

Tabla 3. Frecuencias genotípicas de la población femenina de Santander 49

Tabla 4. Frecuencias genotípicas de la población masculina del departamento de Santander 52

Tabla 5.Test de diferenciación entre frecuencias alélicas de la población masculina y femenina 53

Tabla 6. Frecuencias alelicas para 10 sistemas STRs del cromosoma X en una muestra poblacional de Santander 54

Tabla 7. Test de equilibrio de Hardy-Weimberg 56

Tabla 8. Test de desequilibrio de ligamiento 57

Tabla 9. Parámetros de interés forense 58

Tabla 10. Diferenciación genética para los 10 sistemas STRs del cromosoma X entre poblaciones de Santander y otras poblaciones. 60

Tabla 11. Mutaciones observadas en un total de 51 tríos padre/madre/hija, dúos madre/hijo y un solo dúo padre/hija para los STRs del cromosoma X. 61

Tabla 12. Tasa de mutación por locus para 10 sistemas STRs del cromosoma X 62

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Electroferograma de los 10 STRs tipificados en cada individuo 47

Figura 2. Secuenciación del sistema DXS8377 presente en el padre caso 3 (primer forward) 64

Figura 3. Secuenciación del sistema DXS8377 presente en la hija del caso 3 (primer forward). 65

Figura 4. Secuenciación del sistema DXS8377 presente en el padre del caso 3 (primer reverse) 66

Figura 5. Secuenciación del sistema DXS8377 presente en la hija del caso 3 (primer reverse) 67

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Diagrama de selección de la muestra de individuos relacionados 39

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO	84

GLOSARIO

CASOS DE DUOS: Casos de paternidad disputada que consisten en hijo (a)/padre putativo ó hijo(a)/madre.

DNA: Ácido desoxiribonucleico. Molécula que codifica la información genética, presente en el núcleo celular.

GENOTIPO: Serie completa de genes contenidos en el material genético presente en un individuo, el término se usa a veces en un sentido más limitado para indicar los alelos existentes en uno o más loci.

HAPLOTIPO: Set de alelos en un cromosoma que tienden a heredarse en bloque.

HEMICIGOTO: Una situación donde una célula diploide posee sólo un alelo para un gen en particular.

HETEROCIGOSIDAD: Probabilidad matemática de que un individuo sea heterocigoto en un loci.

MARCADORES DXS: Identificación cromosoma-especifico de sistemas STR ubicados en el cromosoma X, utilizada comúnmente para describir marcadores forenses.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica rápida de amplificación de fragmentos de DNA

PE: Probabilidad de exclusión. Descrie el poder de un marcador para excluir o no un padre biológico.

STR: Short tandem repeats. Secuencias polimórficas cortas repetidas una detrás de otra.

TASA DE MUTACIÓN: La frecuencia con la cual una mutación particular aparece en una población. Normalmente medida como número de mutaciones/número de meiosis observadas.

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN DE DIEZ MARCADORES STRs DEL CROMOSOMA X EN UNA MUESTRA DE INDIVIDUOS DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER[*]

AUTORES: Pico, A.L.; Gusmao, L.; Castillo., A.[**]

PALABRAS CLAVES: STRs, Cromosoma X, diversidad genética, tasa de mutación, Santander.

DESCRIPCIÓN: El análisis de los STRs del cromosoma X es actualmente de gran interés para el estudio genético de poblaciones y en el campo forense como herramienta en pruebas de filiación. Varios STRs del X han sido recientemente validados para uso forense revelando su eficiencia como complemento de STRs autosómicos y del cromosoma Y, especialmente en casos complejos de filiación; pero cientos de estudios son necesarios para estimar la distribución de frecuencias alélicas, parámetros de interés forense en diferentes poblaciones, la tasa de mutación y el desequilibrio de ligamiento para establecer bases de datos de poblaciónes de referencia.

Este estudio tipificó 218 individuos no relacionados de Santander con 10 STRs del X usando una PCR multiplex para establecer el perfil genético de la población y comparar los resultados con poblaciones historicamente relacionadas. Esta muestra presentó una alta diversidad genética (0,6356-0,9141), un alto poder de discriminación en hombres (1 en $3X10^{6}$) y en mujeres (1 en $9X10^{10}$) para estos 10 sistemas, igualmente un alto poder de exclusión en dúos (99.993%) y en tríos (99.9999%). Se calculó la tasa de mutación para estos marcadores en 94 grupos familiares, estableciéndose una tasa de mutación de 2.74 $X10^{-3}$ (95% I.C. 0,38-5,40) por locus/meiosis para los 10 loci.

Estos marcadores han demostrados tener en la población santandereana una diversidad genética suficientemente elevada para ser usados en pruebas de filiación y de identificación humana. Al igual que este estudio servirá de referencia para otros laboratorios en Colombia que deseen implementar este tipo de marcadores.

[*] Tesis de Grado
[**] Facultad de Salud, Maestría Ciencias Básicas Biomédicas, Adriana Castillo Pico.

SUMMARY

TITLE: GENETIC PROFILE CHARACTERIZATION AND SEGREGATION ANALYSIS OF 10 X-CHROMOSOME STRs IN A SAMPLE OF INDIVIDUALS FROM SANTANDER DEPARTMENT*

AUTHORS: Pico, A.L.; Gusmao, L.; Castillo, A.**

KEYWORDS: STRs, X-Chromosome, genetic diversities, mutation rate, Santander Department.

DESCRIPTION: The study of X chromosome STRs is at the present time of great interest in population genetic studies, specially in the forensic field as well as in kinship testing. Several X-chromosome short tandem repeats (X-STRs) have been recently validated for forensic use revealing their efficiency in supplementing autosomal and Y-chromosomal STR analyses, especially in complex cases of kinship testing. Nevertheless, further studies are still needed on allele frequency distributions in different populations, forensic efficiency parameters, mutation rates and linkage disequilibrium, in order to establish reference population databases.

In this study a total of 218 unrelated individuals from the Santander Department were typed for ten X chromosome STRs using a multiplex PCR in order to establish the genetic profile of this population and also to compare our results with those from historically related populations. In this sample, gene diversities varied between 0.6356 and 0.9141; and for this set of 10 X-STRs a high discrimination power was obtained for both male (1 in $3x10^6$) and female (1 in $9x10^{10}$) samples as well as high mean exclusion chance in duos (99.993%) and trios (99.9999%). Reliable estimates of mutation rates for these markers in 94 family groups, the overall observed mutation rate was of $2.74x10^{-3}$ (95% CI 0.75-7.00 $x10^{-3}$) per locus/meiosis, across the 10 loci.

These markers have demonstrated to have high genetic diversities in the santanderean population sufficiently elevated to be used in kinship testing and human identification. Like this study will serve as reference for other laboratories in Colombia that wish to implement this type of markers.

*Project degree.
** Facultad de Salud, Maestría Ciencias Básicas Biomédicas, Adriana Castillo Pico.

INTRODUCCIÓN

El estudio genético de las poblaciones humanas tiene en la actualidad un gran interés, no solo desde el punto de vista antropológico sino también desde el de la medicina forense. El análisis de polimorfismos de ADN ha tenido un profundo impacto en estos campos, entre los marcadores más utilizados para ello están los que se encuentran en secuencias cuyos motivos de repetición va de 2 a 7 pares de bases repetidas en tandem (STR's), su polimorfismo está determinado por los altos niveles de variabilidad en el número de repeticiones del motivo base.[1] Estos STR's se encuentran distribuidos en todos los cromosomas mayoritariamente, en regiones no codificantes del ADN.

El análisis de *short tandem repeats* (STRs) en el campo de la identificación humana es ahora una práctica de rutina en la mayoría de laboratorios que realizan pruebas forenses y análisis de filiación.[2,3] Los casos convencionales de paternidad en que las muestras de la madre, el presunto padre e hijo(s) están disponibles, se pueden resolver sin mayor complicación con análisis de STRs autosómicos, sin embargo en estudios complejos de parentesco en donde todos los individuos directamente implicados no están disponibles, se dificulta su análisis y se requiere por tanto de la tipificación de marcadores ubicados en cromosomas sexuales para concluir el caso.

El descubrimiento de un gran número de secuencias polimórficas de tipo STRs ubicadas en el cromosoma X han permitido realizar estudios que son de gran importancia no solo en el área de la genética forense sino además en el área de la genética de poblaciones. Estos STRs son un eficiente complemento de los STRs autosómicos en el análisis de casos complejos de filiación, convirtiéndose en una herramienta valiosa para las ciencias forenses, [4,5,6] porque a diferencia de los STRs del cromosoma Y permiten esclarecer casos tanto de paternidad como de maternidad, así como discriminar entre padres alegados que presentan algún tipo de parentesco entre sí y establecer relaciones de hermandad, especialmente cuando los individuos implicados son de sexo femenino.[7]

El estudio de estos marcadores del cromosoma X para el uso forense es reciente, sin embargo los análisis hasta ahora realizados en algunas poblaciones han

---

[1] OGUZTURUN C, THACKER CR, SYNDERCOMBE D. Population study of four X-chromosomal STR loci in the UK and Irish population. International Congress Series 2006; 1288: p. 283.
[2] Ibid. p. 284.
[3] EDELMANN J, et al. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. Forensic Sci Int 2001;124: 215.
[4] OGUSTURUN, C., Op. Cit. p. 284.
[5] HERING S, AUGUSTIN CH, EDELMANN J, et al. DXS10079, DXS10074 AND DXS10075 are STRs located within a 280 kb region of Xq 12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. Int J Legal Med 2003; 116: p. 144.
[6] SZIBOR R, et al. Use of X-linked markers for forensic purposes. Int J Legal Med 2003; 117: p. 67.
[7] AUGUSTIN C, et al. Forensic evaluation of three closely linked STR markers in a 13 kb region al Xp11.23. Internacional Congreso Series 2006; 1288: p. 277.

demostrado el alto poder informativo que poseen y su gran utilidad como una nueva herramienta en el área de la identificación humana y en los análisis complejos de filiación.[8,9]

Por estás razones el uso de estos marcadores en el área forense se ha incrementado, y teniendo en cuenta que cuando nuevos sistemas son introducidos en la práctica forense, es necesario conocer la composición genética para estos marcadores de la población donde serán aplicados, con el fin de evaluar su eficiencia y permitir el análisis matemático complementario para su uso, [10,11] por ello se hace necesario estudiar estos sistemas genéticos para obtener datos de la población santandereana y establecer el valor informativo de estos marcadores, y de esta manera utilizarlos correctamente en estudios forenses. Dicha premisa llevó a la realización de esta investigación, cuyo objetivo principal fue realizar la caracterización genética poblacional mediante el análisis de 10 marcadores STR's del cromosoma X (DXS8378, DXS9898, DXS8377, HPRTB, GATA172D05, DXS6809, DXS7132, DXS101 y DXS6789) en una población santandereana para calcular las frecuencias poblacionales, los parámetros estadísticos de importancia forense, la tasa de mutación de cada uno de los marcadores, y tratar de establecer cual es el componente ancestral en nuestra población para lo cual se realizó un análisis comparativo con poblaciones cercanas e históricamente relacionadas.

Este estudio contribuyó a la creación de una base de datos propia que permite conocer la estructura poblacional del departamento de Santander y a partir de esto, usar los marcadores STRs del cromosoma X en el laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander para resolver situaciones complejas en pruebas de filiación. Al mismo tiempo, este estudio sirve de referencia como estudio pionero para otros laboratorios en Colombia que deseen implementar este tipo de marcadores en la solución de sus casos en particular.

[8]CHEN MY, PU CE. Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377, and DXS9895 in Taiwan. Forensic Sci Int 2004; 146: p. 65.
[9]EDELMANN J, Op. Cit. p. 264.
[10]OGUZTURUN C, Op. Cit. p. 284.
[11]CERRI N, et al. Population data for tour X-chromosomal STR loci in a population simple from Brescia (northern Italy). International Congress Series 2006; 1288: p. 286.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización genética poblacional, mediante el análisis de 10 marcadores STR's del cromosoma X en una población santandereana.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular las frecuencias genotípicas para 10 STR's del cromosoma X en la población de Santander.

- Calcular las frecuencias alélicas para 10 sistemas STRs del cromosoma X en la población santandereana.

- Determinar los parámetros estadísticos de importancia forense como el poder de discriminación, la probabilidad de coincidencia, la heterocigosidad y el poder de exclusión para cada uno de los sistemas estudiados.

- Comparar nuestra población con otras poblaciones ya estudiadas para establecer diferencias genéticas con respecto a estos marcadores.

- Establecer la tasa de mutación de cada uno de los marcadores en la población analizada.

2. MARCO TEORICO

2.1 REGIONES MICROSATELITES DEL GENOMA HUMANO

El estudio de marcadores polimórficos del ADN se ha convertido en una herramienta imprescindible en el análisis genético de vestigios biológicos de interés forense, así como en la investigación biológica de paternidad. A principios de los años noventa se descubrió un gran número de regiones microsatélites o STR en el genoma humano con un elevado grado de polimorfismo, que presentan un tipo de herencia mendeliana simple, son codominantes, fáciles de medir y analizar mediante técnicas de PCR lo cual los hace cien por ciento fiable, reproducibles y automatizables.[12,13]

Los STRs (Short tandem repeats) son segmentos cortos de ADN que se encuentran de forma aleatoria en el genoma humano, en su mayoría, haciendo parte de regiones no codificantes, de los telómeros y en menor proporción en las regiones codificantes del ADN.[14] Estos sistemas están compuestos por una unidad de secuencia de 2 a 7 pares de bases que se repiten una tras otra y cuya base del polimorfismo genético esta dada por la variabilidad en el número de veces que se repita esta unidad de secuencia. De acuerdo al número de pares de bases que conforma dicha unidad de secuencia o motivo de repetición, los sistemas pueden ser de tipo dinucleotídico, trinucleotídico, tetranucleotídico entre otros, y aunque todos ellos presentan un alto grado de variabilidad en las poblaciones, asociaciones científicas como la Internacional Society of Forensic Haemogenetics (ISFH), recomienda utilizar en la práctica forense, los STRs tri-tetra y pentaméricos, que posean ciertas características genéticas en la población tales como estar en Equilibrio de Hardy Weinberg, ser altamente polimorficos, tener baja tasa de mutación y no presentar desequilibrio de ligamiento.[15]

Los STRs presentan además una variabilidad estructural en las unidades de repetición lo cual permite clasificarlos como: a) STRs simples o de baja microvariación: aquellos que presentan una sola unidad de repetición, b) STRs compuestos o de microvariación intermedia: los que presentan 2 o mas unidades de repetición contiguas diferentes que varían tanto en secuencia como en longitud; y c) los STRs complejos o de alta microvariación: aquellos que contienen varios bloques de unidades de repetición de longitud variable, con secuencias

[12]EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA, CASKEY CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeat. Am J Hum Genet 1991; 49: p. 748.
[13]EDWARDS A, HAMMOND HA, JIN L, CASKEY CT, CHAKRABORTY R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric repeat loci in four human population groups. Genomics 1992; 12: p.242.
[14]EDWARDS A, Op. Cit. p. 748.
[15]ALER M, et al. Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample. Forensic Sci Int 2007; doi:10.1016/ j.forsciint.2006.10.023.

intermedias más o menos variables.[16,17] Todos ellos han demostrados ser lo suficientemente polimórficos; en especial, los STRs complejos donde la presencia de alelos intermedios y la sustitución simple de bases en algunas unidades ocasiona importantes variaciones distinguibles entre la población.

Debido a sus particulares ventajas estas regiones son en la actualidad uno de los marcadores de elección en el campo de la identificación humana, en estudios poblacionales y se han convertido en los más utilizados en el área de la genética forense. Además han sido de gran ayuda en genética clínica, donde su uso ha permitido el diagnóstico de diversas enfermedades de origen genético como son la distrofia miotónica,[18] la fibrosis quística,[19] la distrofia muscular de Duchenne,[20] así como la inestabilidad genética de este tipo de regiones repetitivas se hace evidente en algunos tipos de neoplasias como el cáncer de colon no polipósico heredado[21] y el cáncer de vesícula,[22] constituyéndose en una herramienta para determinar el origen genético de la neoplasia.

2.1.1 STRs del cromosoma X. El cromosoma X es uno de los cromosomas humanos más largos con una longitud de aproximadamente 200 cM, posee 160 millones de pares de bases y alrededor de 1200 genes, 392.586 regiones de polimorfismo de una base (SNPs) y 2100 marcadores que se localizan a lo largo de este cromosoma, lo cual permite considerar su gran complejidad e importancia en el desarrollo humano.[23]

En el género femenino el cromosoma X esta presente como un par homólogo similar a los autosomas, donde uno es pasado a su descendencia, después de presentar eventos de recombinación entre ellos. Contrario a esto, los hombres poseen un solo cromosoma X y los eventos de recombinación que presenta con el cromosoma Y son muy pequeños y solo alteran la información ubicada en la región telomérica, por tanto este cromosoma X pasa a las descendientes femeninas como una fiel copia del cromosoma presente en el padre.

El descubrimiento durante las últimas décadas, de un gran número de secuencias polimórficas (STRs) ubicadas en el cromosoma X despertó un gran interés sobre su aplicación en el campo de la genética clínica, sin embargo a pesar de su

[16]URQUHART A, KIMPTON CP, DOWNES TJ, GILL P. Variation in short tandem repeat sequences a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. Int J Leg Med 1994; 107:p. 15.
[17]BRIKMANN B. The STR approach. Adv Forensic Haemogenetics 1996; 6:p. 44.
[18]MULLY JC, et al. Predictive diagnosis of myotonic dystrophy with flanking microsatellite markers. J Med Genet 1991; 28:450.
[19]MORRAL N, ESTIVILL X. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. Genomics 1992; 13: p. 1363.
[20]OUDET C, HEILIG R, HANAUER A, MANDEL JL. Nonradiactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5´end of the dystrophin gene and estimation of intragenic recombination. Am J Hum Genet 1991; 49:p. 315.
[21]OGINO S, et al. TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. Human Pathology 2007. doi:10.1016/j.humnpath.2006.10.005.
[22]BURGER M, et al. Elevated microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats does not correlate with clinicopathologic features of bladder cancer. European Urology 2006; 50: p. 773.
[23]http://www.gdb.org .GDB; Genome Database

elevado poder de individualización su uso es aún muy limitado en el campo forense.

Los primeros dos sistemas microsatélites del Cromosoma X que jugaron un papel significativo en estos campos fueron el HPRTB y HUMARA localizados en Xq26.1 y Xcen-q13 respectivamente, descubiertos en 1991.[24] En la actualidad la base de datos del genoma humano reporta 26 marcadores STRs trinucleotídicos y 90 tetranucleotídicos ubicados en el cromosoma X;[25] de los cuales 26 de estos loci han sido validados para uso forense. Estos sistemas presentan alelos de un tamaño muy pequeño, generalmente entre 100 a 350 nucleótidos lo cual favorece su utilización en muestras en estado de degradación elevado.[26,27, 28,29,30,31,32,33,34,35]

2.1.1.1Ligamiento entre marcadores del cromosoma X. Cuando los marcadores estas localizados en el mismo cromosoma, la posibilidad de segregarse en haplotipo aumenta; en el caso de los STRs del cromosoma X es particularmente importante estudiar la transmisión simultánea de los diferentes marcadores para identificar posibles asociaciones entre los loci. La condición de hemizigocidad de las células masculinas con respecto a este cromosoma permite realizar un análisis de ligamiento más eficiente para estos loci. Generalmente, los alelos presentes en un loci se recombinan durante la meiosis, y su frecuencia de recombinación depende de la distancia genética inter-marcadores, para los marcadores del cromosoma X, este fenómeno esta limitado a la meiosis femenina y su tasa de recombinación es de alrededor de 0.8%.[36]

Si la estabilidad meiótica de los haplotipos es suficientemente alta, el desequilibrio de ligamiento (LD) se hace evidente, y se refiere a una "asociación no-aleatoria de los alelos de diferentes locus";[37] esto implica que los diferentes alelos de los loci no se están segregando al azar y por tanto no es posible inferir las frecuencias haplotípicas de una población a partir de sus frecuencias alélicas. El desequilibrio de ligamiento, mide la desviación de las frecuencias haplotipicas de una población

[24]EDWARDS A, CIVITELLO A, Op. Cit. p. 747.
[25]http://www.gdb.org .GDB; Genome Database
[26]EDELMANN J, et al. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. Forensic Sci Int 2001;124: p. 215.
[27]HERING S, Op. Cit. p. 42.
[28]ZARRABEITIA MT, et al. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. Forensic Sci Int 2002; 129: 85.
[29]EDELMANN J, et al. Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. Forensic Sci Int 2002; 125: p.217.
[30]CHEN MY, et al. Population data on X chromosome short tandem repeat loci HPRTB and AR in Taiwan. Forensic Sci Int 2002; 126: p.171.
[31]KOYAMA H, et al. Y-STR haplotype data and allele frequency of the DXS10011 locus in a Japanese population sample. Forensic Sci Int 2002; 125: p. 273.
[32]SZIBOR R, et al. . Sequence structure and population data of the X-linked markers DXS7423 and DXS8377 clarification of conflicting statements published by two working groups. Forensic Sci Int 2003;134: p. 72.
[33]EDELMANN J, SZIBOR R. The X-linked STRs DXS7130 and DXS6803. Forensic Sci Int 2003; 136: p. 73.
[34]HUANG D, YANG Q, YU C, YANG R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite markers HumDXS6803 and HumDXS9895 for forensic purpose. Forensic Sci Int 2003; 133: p. 246.
[35]EDELMANN J, SZIBOR R. Validation of the X-linked STR DXS6801. Forensic Sci Int 2005; 148: p. 219.
[36]SCHAFFNER SF. The X chromosome in population genetics. Nature Genetics 2004; 5: p.46.
[37]SZIBOR R. X chromosomal markers: Past, present and future. Forensic science international: Genetics 2007; 1: p. 95.

específica con respecto al producto de las frecuencias alélicas correspondientes.[38,39] Este sin embargo, no solo es una característica que dependa de la distancia entre los marcadores, se pueden observar a través del genoma, regiones con extenso LD interrumpido por regiones donde este no se presenta; el modelo de LD es el resultado de muchos factores, incluyendo la deriva génica, la mezcla, la migración, la estructura de la población, la variabilidad en la tasa de mutación, la variabilidad en la tasa de recombinación y la selección natural. [40]

Por tal razón, determinar el ligamiento de estos marcadores en una población puede ser especialmente importante, en particular si las poblaciones son mezcladas ó en poblaciones posiblemente subestructuradas, como las de Sur América donde se presenta un componente ancestral Amerindio, Africano y Caucásico.

Debido a la alta tasa de mutación, los STRs tienden a presentar menor LD que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). En algunas regiones del cromosoma X se ha observado LD significativos para algunos marcadores tales como DXS7424 y DXS101,[41] el DXS6801, DXS6809 y DXS6789,[42] DXS10076, DXS10077 y DXS10078; [43] DXS10079, DXS10074 y DXS10075;[44] y aunque el desequilibrio de ligamiento no esta completamente dilucidado en el genoma humano, estudios realizados entre microsatélites han proporcionado nuevas perspectivas acerca del origen e historia de las poblaciones humanas y en especial, el LD entre marcadores del cromosoma X pueden ser altamente eficiente para revelar diferencias étnicas. [45]

2.1.1.2 Aplicaciones de los microsatélites del cromosoma X. Los STRs del cromosoma X son una gran herramienta en el área de la genética clínica facilitando el diagnóstico de enfermedades genéticas y la construcción de mapas de ligamiento, así como en la genética de poblaciones y en el campo forense como herramienta complementaria de los STRs autosómicos, en las pruebas de filiación y en la identificación de individuos. [46,47]

2.1.1.2.1 Construcción de mapas genéticos y estudios de enfermedad. Los microsatélites son una gran herramienta para la construcción de detallados mapas de ligamiento; así como identificación de genes de interés.

[38]SZIBOR R, KRAWCZAK M., Op. Cit. p. 71.
[39]SZIBOR R. Op. Cit. p.95.
[40]SCHAFFNER SF. Op. Cit. p. 46.
[41]EDELMANN J, Op. Cit. p. 220.
[42]SZIBOR R, Op. cit. p. 367.
[43]AUGUSTIN C, CICHY R, Op. Cit. p. 278
[44]HERING S, et al. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280 kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. Int J Legal Med 205; DOI10.1007.
[45]SZIBOR R. X chromosomal markers: Past, present and future. Forensic science international: Genetics 2007; 1: P.96.
[46]EDELMANN J, et al. Op. Cit. p. 100.
[47]SHIN SH, et al. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. Forensic Sci Int 2005; 147: P.36.

Todos los marcadores pueden ser utilizados en mapas de ligamiento, sin embargo para ello se requiere, en primer lugar, que los alelos se segreguen independientemente y que además estos puedan ser monitoreados a través del pedigrí. Los loci situados en cromosomas diferentes podrían recombinarse libremente durante la gametogénesis parental hasta un 50%; mientras que, si se encuentran en el mismo cromosoma recombinarían con una frecuencia de 0 a 50% dependiendo de la distancia presente entre ellos. En los marcadores ubicados en el cromosoma X, solo 2/3 de estos recombinan en cada generación. [48]

El estudio de un número de marcadores y la asociación de varios alelos de estos marcadores en poblaciones que presentan una enfermedad, permiten que se puedan identificar las regiones del genoma donde puede encontrarse el gen responsable. En enfermedades que presentan una herencia ligada al cromosoma X como la hemofilia, la distrofia muscular de Duchenne, la deficiencia de G6PD, o el síndrome de Lesch-Nyhan se ha podido identificar la localización del gene, por medio de la construcción de los mapas genéticos realizados a partir de estos marcadores ubicados en el cromosoma X.

En el campo de la genética clínica, los marcadores STRs del cromosoma X también han contribuido en el diagnóstico predictivo del síndrome de X frágil donde se ha descrito la expansión de STRs triméricos como causa de la enfermedad.[49] Y se han convertido además en una buena herramienta para establecer formas comunes de inestabilidad genómica como la perdida de heterozigocidad y la inestabilidad de microsatélites presentes en cáncer de cervix.[50]

2.1.1.2.2 Pruebas de filiación. El principio de las pruebas de paternidad utilizando marcadores genéticos, consiste en la comparación del genotipo de la descendencia con el de sus progenitores. De acuerdo al principio mendeliano uno de los dos alelos que presenta un individuo provendría del padre y el otro de la madre. En los casos de filiación donde se dispone de todos los individuos directamente involucrados (caso simple de filiación), cuando no se duda de la maternidad, el análisis se realiza mediante una comparación entre el perfil genético obtenido del hijo y el de la madre; las características que no procedan de ella, deberán provenir y por tanto existir en el que sea su padre biológico.

Durante la última década las pruebas de paternidad se han realizado mediante el análisis de marcadores STRs autosómicos que alcancen una probabilidad de exclusión *a priori* del 99.99% y algunos marcadores del cromosoma Y que permiten establecer linaje paterno en los casos más complejos.

---

[48]SCHAFFNER SF. Op. cit. p. 45.
[49]RICHARDS RI, SUTHERLAND GR. Fragil X syndrome: the molecular picture comes into focus. Trends Genet 1992; 8: p. 251.
[50]EDELMANN J, LESSIG R, HERING S, HORN LC. Loss of heterozygosity and micro satellite instability of forensically used STR markers in human cervical carcinoma. International Congress Series 2004; 1261: p.499.

Los STRs del cromosoma X han revelado recientemente su eficiencia como complemento del análisis con marcadores autosómicos y del cromosoma Y. [51,52,53] Alcanzando en algunos casos valores de probabilidad igual o superiores a los alcanzados con los marcadores autosómicos.

Algunas de las situaciones en donde estos sistemas son de gran utilidad se presentan a continuación:

a. Pruebas de paternidad en tríos y dúos: Cuando un caso de paternidad involucra a un trío común (padre/madre/hijo(a), usualmente este se resuelve con STRs autosómicos; sin embargo, el análisis abordado con marcadores de cromosoma X pueden presentar una mayor eficiencia en la resolución de estos casos. En análisis de maternidad, donde se establece la filiación madre/hija, los STRs del X son equivalentes a los marcadores autosómicos y no proveen una ventaja especifica,[54,55,56,57,58] pero en los casos en que la filiación a establecer es madre/hijo o padre/hija, los marcadores del X son mucho más eficientes ya que alcanzan un poder de exclusión mayor. [59]

b. Casos complejos de filiación: En los casos complejos de paternidad, donde el presunto padre no esta disponible para el análisis, los marcadores STRs del cromosoma X presentan su mayor ventaja, ya que estos pueden establecer las relaciones entre los miembros de un pedigrí a pesar de las grandes distancias entre ellos. Sin embargo esto no puede ser posible si la línea generacional del cromosoma X se interrumpe por una relación padre/hijo.[60] A pesar de los eventos de recombinación que tiene el cromosoma X en las mujeres, cuando la distancia entre los marcadores STRs es muy estrecho, se pueden construir haplotipos parciales que son heredados a sus descendientes, lo cual facilita el análisis de filiación en estos casos complejos. [61,62,63]
Se han establecido algunos haplotipos localizados en las regiones Xp22.2, Xq12, Xq26 y Xq28[64] que pueden ser utilizados en estudios de filiación. Por tanto si se evalúan en un caso, marcadores del X que estén ligados, se deben emplear en los

[51]OGUZTURUN C, Op. Cit. P. 283.
[52]EDELMANN J, Op. Cit. p. 216.
[53]HERING S, AUGUSTIN C, EDELMANN J,KUHLISCH E, Op. Cit. p. 10.1007.
[54]CERRI N, VERZELETTI A, Op. Cit. p. 286.
[55]ATHANASIADOU D, et al. Development of a quadroplex PCR system for the genetic analysis of X-chromosomal STR loci. International Congress Series 2003; 1239: p.312.
[56]BINI C, et al. Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study. Forensic Sci Int 2005; 153: p.232.
[57]TURRINA S, ATZEI R, FILIPPINI G, DE LEO D. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. FSI: Genetics. 2007; p. 10.1007.
[58]GOMES I, et al. Analysis of 10 X- STRs in three African populations. FSI: Genetics 2007; doi:10.1016/j.fsigen. 2007.01.001.
[59]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. Cit. p. 71.
[60]Ibid. p. 69.
[61]AUGUSTIN C, CICHY R, Op. Cit. p. 278.
[62]HERING S, Op. Cit. p. 1007.
[63]MORENO MA, et al. Validation of five X-chromosomal STRs DXS6800, DXS6807, DXS6798, DXS8377, and DXS7423 in an Antioquian population simple. Internacional Congress Series 2006; 1288: p.297.
[64]SZIBOR R. Op. Cit. p. 94.

cálculos matemáticos, las frecuencias haplotípicas en lugar de las frecuencias alélicas.

Estos marcadores tienen además un gran poder para establecer relaciones cuando nos encontramos frente a dos presuntas hermanas o medias hermanas que compartan el mismo padre; y cuya madre no esta disponible para ser tipada; en estos casos las hermanas deben compartir al menos uno de los alelos de cada marcador, haciendo posible la identificación del haplotipo paterno para poder establecer la relación de hermandad.[65] En estos casos, si se dispone de la abuela paterna, o de hermanos del presunto padre a partir de la cual se pueda reconstruir el genotipo de la abuela paterna, se puede establecer fácilmente la filiación ya que los alelos del X, presentes en el presunto padre han sido heredados por las nietas y de hecho deben existir en la abuela paterna. [66]

c. Casos de Paternidad que involucran individuos con cosanguinidad: En los casos que involucran dos presuntos padres que presentan consanguinidad, el poder de exclusión de los marcadores STRs autosómicos disminuye y los STRs del cromosoma X pueden ser más eficientes. Si los padres alegados tienen una relación padre/hijo, los alelos presentes en el cromosoma X de los dos individuos serán diferentes por ascendencia, aumentando la probabilidad de excluir a uno de ellos.

Si la relación entre los padres alegados es de hermandad, los alelos del cromosoma X materno son heredados con una probabilidad de 0.5, igual a la probabilidad que presentan dos alelos de un locus ubicado en los autosomas. Sin embargo si los marcadores están ligados, el análisis de los haplotipos del X aumenta la probabilidad de exclusión.

En general, los marcadores STRs del cromosoma X cuando son utilizados en pruebas de filiación, presentan un poder de exclusión igual o superior a los STRs autosómicos, pero es importante descartar la presencia de aberraciones cromosómicas del X, antes de usar sus marcadores, para no afectar la exactitud de las conclusiones derivadas del análisis.

2.1.1.2.3 Identificación humana. El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores, los hace muy útiles para identificaciones individuales, ya que resulta muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, al ser analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos. El poder de discriminación (PD) para los STRs del cromosoma X varían dependiendo del sexo, cuando la comparación se realiza entre individuos femeninos el PD es igual que para los sistema autosómicos, pero si la comparación se realiza entre individuos de sexo masculino, el PD disminuye con relación a los marcadores autosómicos, esto se

[65]HERING S, Op. Cit. p. 43.
[66]SZIBOR R. Op. Cit. p. 96.

debe a que en los hombres por tener un solo del cromosoma X, solo un alelo es analizado por cada marcador. [67]

Como ya se mencionó estos sistemas presentan alelos con un tamaño muy pequeño (100-350 pb) lo cual favorece la amplificación en muestras con un alto grado de degradación, tales como muestras provenientes de exhumación, identificación de victimas de la guerra, desastres en masas o muestras prehistóricas. En análisis de mezclas de ADN, los marcadores STRs del cromosoma X son más poderosos que los marcadores autosómicos en los casos en que se requiere identificar trazas de ADN femenino en mezclas con muestras de ADN masculino. [68]

2.1.1.2.4 Estudios de genética poblacional. Esta representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que permiten estimar los niveles de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones.

Durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites o STRs, especialmente los del cromosoma Y, los cuales mediante el análisis de los datos poblacionales y el cálculo de las frecuencias alélicas permiten establecer las distancias genéticas así como realizar análisis filogenéticos y de estructura de las poblaciones. [69]

El cromosoma X tiene un curioso rol en la genética de poblaciones. La presencia de una sola copia en los hombres hace más fácil su estudio que para los marcadores autosómicos, ya que permite establecer haplotipos que son necesarios para inferir la filogenia de una región, esta característica similar al ADN mitocondrial y al cromosoma Y explica su uso en estudios especialmente direccionados hacia la historia de las poblaciones humanas, con el fin de establecer las diferencias históricas entre hombres y mujeres.

La presencia de recombinación es una característica que distingue el cromosoma X del cromosoma Y y del ADN mitocondrial, mientras que estos dos últimos por heredarse en haplotipo describen una sola historia genealogíca, el cromosoma X a través del proceso de recombinación en todas las generaciones, hace que diferentes regiones puedan presentar diferente historia. Sin embargo, el mayor potencial del cromosoma X en genética poblacional, se ha demostrado en los estudios filogenéticos, cuyo objetivo central ha sido el debate acerca del origen de las poblaciones no- africanas, en los cuales naturalmente el cromosoma Y y el ADN mitocondrial han contribuido cada uno con una filogenia, pero las evidencias más concretas han sido aportadas por el cromosoma X. [70]

[67] SZIBOR R, e tal. Op. Cit. p. 67.
[68] SZIBOR R.Op. Cit. p. 97.
[69] CARRACEDO A, et al. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding the reproducibility and robustness of the Y-chromosome STRs DYS19, DYS389I and II, DYS 390 and DYS 393 in a PCR pentaplex format. FSI 2001; 119: p.28.
[70] Schaffner SF. Op. cit. p. 43.

2.2 VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

Dobzhansky (1950) definió el concepto de población mendeliana como un grupo de individuos que comparten en el tiempo y en el espacio un componente genético común, estos se reproducen entre sí de forma aleatoria y aunque es posible que se presente flujo genético con otras poblaciones, pueden encontrarse diferencias en las frecuencias génicas respecto a otros grupos vecinos.

La constitución genética de una población puede cambiar de generación en generación y el objeto de la genética de poblaciones es analizar las consecuencias de las leyes de la herencia mendeliana sobre la composición genética de las poblaciones, en especial el efecto de la mutación, selección, migración y deriva sobre las frecuencias génicas que definen la estructura poblacional, así como los cambios de generación en generación.

2.1.2 Equilibrio de Hardy Weimberg (HWE). Las poblaciones que se cruzan de manera aleatoria, que presenta un tamaño suficientemente grande, en las que el efecto de migración es casi nulo, las mutaciones son muy bajas y la selección natural no afecta las frecuencias; cumplen con el principio de Hardy- Weinberg, [71] el cual plantea que la población se encuentra en equilibrio y por tanto las frecuencias genotípicas están determinadas tan solo por las frecuencias génicas, y éstas permanecen constantes de generación en generación.

Este modelo matemático esta dado por:

$$AA= p2 \qquad Aa=2pq \qquad aa=q2 \qquad (p+q)2=1$$

Para considerar que una población se encuentre en equilibrio debe cumplir los siguientes supuestos:

- El tamaño de la población analizada debe ser suficientemente grande con el fin de que las frecuencias no estén sujetas a cambios por errores del muestreo. Denominado “deriva génica aleatoria”.

- Los cruzamientos entre individuos de una población deben realizarse aleatoriamente y la fertilidad es la misma para todas las clases de cruzamientos (Panmixia).

- La distribución de las frecuencias alélicas deben mantenerse de una generación a la siguiente, sin ser afectadas por fuerzas evolutivas tales como la migración, la mutación, la deriva, la selección.

[71] HARD D, CLARK AC. Principles of populations genetics, 3ª Ed. Sinauer associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts 1997; p.73.

• En las condiciones anteriores, las frecuencias genotípicas de la descendencia depende solo de las frecuencias de la generación parental.

El modelo matemático propuesto en 1908 por el inglés George Hardy y el alemán Wilhelm Weinberg permite predecir las frecuencias teóricas de los genotipos evaluando si las proporciones esperada no son diferentes de las observadas mediante un test de chi cuadrado(X^2).[72]

Cuando la población se desvía de manera significativa de estas proporciones se habla de desequilibrio de Hardy y Weinberg, la cual puede deberse a que alguna fuerza evolutiva este actuando sobre ella. Estudios realizados en los STRs del cromosoma X refieren la condición de HWE para las diferentes poblaciones estudiadas, [73,74,75] sin embargo en una muestra de 145 individuos no relacionados procedentes de Valencia (España), se ha reportado desviaciones del HWE en el sistema DXS101 la cual se produjo por un exceso de homocigosidad (10%) que puede estar sugiriendo la presencia de alelos nulos en esta población. [76]

2.2.2 Fuerzas evolutivas. Los mecanismos evolutivos tienden a alterar las frecuencias génicas de las poblaciones. Si una población no cumple con el principio de HW se asume que un evento de microevuloción puede estar ocurriendo, este proceso tiene lugar de una generación a otra y es necesario precisar cual o cuales fuerzas evolutivas están actuando sobre los genes.

2.2.2.1 Mutación. Se denomina mutación a un cambio ocurrido en el material genético, en un locus determinado y es considerado un mecanismo importante por el cual se introduce variabilidad en una población. Las mutaciones que tienen importancia desde el punto de vista evolutivo son aquellas que se presentan en las células germinales ya que se transmiten a la descendencia.

Los microsatélites a diferencia de otros marcadores, presentan un patrón diferente de mutación y para entender este proceso mutacional se han establecido dos principales modelos que son: Infinite Allele Model (IAM) y el Stepwise Mutation Model (SMM). En el IAM, se asume que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir los nuevos alelos mutados son siempre diferentes a los que ya existían en la población original. En el SMM los alelos solo pueden mutar por la ganancia o perdida de una sola unidad de repetición, y debido a esto pueden existir alelos mutados iguales a los alelos presentes en la población (homoplasia). [77]

---

[72] Ibid. p. 77.
[73] SZIBOR R, EDELMANN J, Op. Cit. p. 72.
[74] SZIBOR R, LAUTSCH S, PLATE I, BECK N. Population data on the X chromosome short tandem repeat locus HumHPRTB in two regions of Germany. J Forensic Sci 2000; 45: p.232.
[75] SZIBOR R, EDELMANN J, HERING S, et al. Cell line DNA typing in forensic genetics—the necessity of reliable standards. Forensic Sci Int 2003; 138:p. 40.
[76] ALER M, SÁNCHEZ-DIZ P, Op. Cit. p. 10.023.
[77] GOLDSTEIN BD, SCHLOTTERER C. Microsatellites evolution and applications. New York: Oxford University Press, 1999. p. 352.

Las mutaciones en los STRs predominantemente suceden en las meiosis paternas, esto se debe a que en las células espermáticas ocurren 10 veces más divisiones celulares hasta formar el zigoto que las realizadas por el ovulo,[78,79] y se generan principalmente por la ganancia o perdida de una repetición, aunque en el sistema HPRTB mutaciones con pérdida o ganancia de solo 2 nucleótidos(lo cual conlleva a generar alelos intermedios) han sido reportadas. [80]

2.2.2.1.1 Tasa de mutación. Precisar la tasa de mutación es un prerrequisito para la utilización de marcadores genéticos en pruebas de filiación.[81] La frecuencia de aparición de una mutación humana es muy baja y se ha demostrado a través de estudios en STRs autosómicos que la tasa de mutación está influenciada por la estructura y que además existe una correlación exponencial con el número de unidades ininterrumpidas en la repetición. [82,83]

Estimar la tasa de mutación es crucial en el análisis de pruebas de filiación, y a pesar de que pocos estudios se han realizado en este campo con respecto a los marcadores del cromosoma X y que el número de meiosis estudiadas hasta ahora no es suficientemente grande, se ha estimado una tasa de mutación de 2.09 $X10^{-3}$ por meiosis, la cual es similar a la presentada por los sistemas STRs autonómicos.[84]

Sin embargo en los marcadores STRs del cromosoma X se han encontrado tasas de mutación muy variable, los sistemas con una estructura de repetición larga y homogénea tales como el DXS10011 y DXS8377 y HPRTB son más propensos a la inestabilidad. Para los sistemas HPRTB y DXS8377 Szibor y col han reportado tasas de alrededor del 0.4% y 0.6% respectivamente, mientras que en sistemas como el DXS101, DXS9895, DXS9898 y DXS6789 no se han reportado mutaciones. [85,86,87]
Debido a que las tasas de mutación serían más altas en los hombres, se han calculado tasas de mutación por sexos para algunos sistemas tales como el DXS10011 donde la tasa de mutación paterna (0.039) es 6 veces mayor que la materna (0.0064). [88]

[78]TURRINA S, ATZEI R, FILIPPINI G, DE LEO D, Op. Cit, in press.
[79]PEPINSKI W, et al. X- chromosomal polymorphism data for the ethnic minority of Polish Tatars and the religious minority of Old Believers residing in northeastern Poland. FSI : Genetics. 2007; doi:10.1016/j.fsigen.2007.01.007.
[80]MERTENS G, GIELIS M. Mommers N, Mularoni A, Lamartine J, Heylen H. Mutation of the repeat number of the HPRTB locus and structure of rare intermediate alleles. Int J Legal Med 1999; 112: p. 192.
[81]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. Cit. p. 69.
[82]GOMES I, ALVES C, Op. Cit. p. 001.
[83]VERZELETTI A, CERRI N, GASPARINI F, DE FERRARI F. X-chromosome polymorphism on DXS8378,DXS7132, HPRTB and DXS723 loci in 130 individuals from Brescia (northern Italy).JLM. 2007; doi:10,106/j.legalmed.2006.11.001.
[84]SZIBOR R, Op. Cit. 69.
[85]Ibid. p. 69.
[86]TURRINA S, Op. Cit. p. 01.007.
[87]EDELMANN J, SZIBOR R. DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. Int J Legal Med 2001; 114: p303.
[88]HERING S, et al. DXS10011: studies on structure, allele distribution in three populations and genetic linkage to further q-telomeric chromosome X markers. Int J Legal Med 2004; 118: p. 316.

2.2.2.2 Selección. La selección natural tiene dos importantes funciones en evolución: La posibilidad de adaptación y la supresión de mutaciones deletéreas. El efecto directo de ésta produce un aumento o disminución de las frecuencias génicas o genotípicas como resultado de una fertilidad o una supervivencia diferencial de sus portadores, lo cual favorece su adaptación al ambiente. Cualquier variante hereditaria que incremente la probabilidad de sobrevivencia de un individuo, aumentará en frecuencia en las siguientes generaciones.

La presencia de una sola copia del cromosoma X en los hombres hace que los alelos ligados al X sean más expuestos a selección natural, haciendo del cromosoma X un medio atractivo para examinar el rol de la selección en la historia humana. [89]

2.2.2.3 Migración. El movimiento de individuos entre poblaciones que difieren en su componente genético puede producir cambios importantes en las frecuencias alélicas de las poblaciones.

El movimiento de genes de una población a otra se denomina ¨flujo genético¨. En la migración los cambios en las frecuencias alélicas son proporcionales a las diferencias de frecuencias entre la población donadora y receptora y también son proporcionales a la tasa de migración. El flujo genético ha tenido una gran influencia en el proceso de evolución humana dado que por una parte ha contribuido a la disminución de la variabilidad entre las poblaciones y, por otra parte, ha incrementado la variabilidad intrapoblacional.[90]

A lo largo de la historia evolutiva la especie humana ha demostrado ser una especie extremadamente móvil. En el pasado han tenido lugar grandes movimientos de poblaciones humanas, unos dirigidos a tierras deshabitadas a fin de colonizarlas produciendo un traslado de genes, y otros han llegado a tierras habitadas produciendo una transferencia de genes de una población a otra (mestizaje), en tiempos recientes; esta movilidad se ha incrementado drásticamente cambiando la composición de las poblaciones.

2.2.2.4 Deriva genética. Puesto que las poblaciones naturales tienen un tamaño finito, en cada generación hay una transmisión aleatoria de los gametos de los padres a los hijos que hace que las frecuencias de los alelos fluctúen de generación en generación.

La deriva genética es el efecto acumulativo de esta fluctuación genética durante muchas generaciones, este es un fenómeno que se da en pequeñas poblaciones, por el cual la frecuencia de cualquier alelo puede experimentar fluctuaciones debidas al azar de una generación a la siguiente. El efecto de la deriva genética

[89]SCHAFFNER SF. Op. cit. p. 44.
[90]MORENO P, GENE M. Fundamentos de la variabilidad genética de las poblaciones humanas. En: La prueba del AND en medicina forense. Barcelona: Masson, S.A.; 1999. p.263.

es aplicable tanto al establecimiento de nuevos alelos mutantes en una población como a la ocurrida debido al aislamiento de una pequeña nueva población a partir de otra mayor, donde las frecuencias génicas pueden ser considerablemente distintas a la población de origen.

La deriva genética es más marcada para el cromosoma X que para los autosómas, como resultado de esto la estructura de la población puede ser más variada con respecto a marcadores del cromosoma X, esto quiere decir que las poblaciones pueden diferir más en sus cromosomas X que en los autosómas y por lo tanto la distancia genética entre las poblaciones son significativamente mayores para el cromosoma X. [91]

2.3 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

El tema de la estructura en la población ha tenido desde hace varios años un abordaje amplio, el cual ha sido de gran aplicación en estudios de mapeo asociativo y composición genética de las poblaciones.

Para los estudios de la estructura de la población los análisis del estimador Fst definido por Sewall Wright en 1951 ha mostrado ser una herramienta útil para dilucidar los patrones y extraer la variación genética presente entre y dentro de las poblaciones. Según estos estadísticos, la variabilidad de una población global puede ser subdividida en muchas subpoblaciones y que dicha subdivisión en la población supone un efecto de endogamia que se evidencia por una perdida de la heterocigosidad. [92]

El Fst o coeficiente de endogamia evalúa la correlación entre dos gametos tomados al azar de cada una de las subpoblaciones y mide el grado de diferenciación genética entre las dos subpoblaciones, este puede ser calculado utilizando marcadores genotípicos polimórficos así: $Fst= var(p_k)/p(1-p)$ donde p_k corresponde a la frecuencia de un alelo en la población k y p es la frecuencia total de los alelos en todas las subpoblaciones.[93] Los resultados se interpretan de acuerdo con la Tabla 1.

[91] SCHAFFNER SF. Op. cit. p. 44.
[92] HARD D, CLARK AC. Op. Cit. p. 71.
[93] REICH D, GOLDSTEIN D, Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. Genetic epidemiology 2000; 20: p. 10.

Tabla 1. Interpretación de los valores para Fst.

VALOR Fst	CANTIDAD DE ESTRUCTURA	INTERPRETACIÓN
1	Máxima	Se presenta la máxima estructura o diferenciación de la población y fijación de alelos
0.15-0.25	Muy alta	Se presenta muy alta diferenciación
0.005-0.15	Moderada	Se presenta moderada diferenciación
0-0.005	Poca	Se presenta poca diferenciación

Fuente**:** Reich D, Goldstein D, Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. Genetic epidemiology 2000; 20: 4-16.

En la tabla se puede observar los diferentes grados de subestructuración de una población de acuerdo a los valores de Fst

2.4 PARAMETROS FORENSES

Existe un gran número de estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y el potencial a priori que presentan los sistemas utilizados en la práctica forense. Los estadísticos más empleados son: El poder de discriminación, la heterozigocidad, la probabilidad de coincidencia y el poder de exclusión a priori.

2.4.1Poder de discriminación (PD). Es la capacidad que posee un marcador o una serie de marcadores de diferenciar un individuo analizado, con otro tomado al azar en la población. El PD depende del número de loci analizados y del polimorfismo de estos. Para los marcadores del cromosoma X, el PD se calcula mediante la formula propuestas por Desmarais: [94]

$$PD(\text{hombres}) = 1-\sum pi^2 \qquad PD\ (\text{mujeres}) = 1-2\ (\sum pi^2)^2 + \sum pi^4$$

Los valores de PD en los marcadores STRs del cromosoma X varían dependiendo del sexo y son generalmente mas bajos que para los marcadores autosómicos, esto se debe a que los hombres son diplóides para todos los autosómas pero solo presentan un alelo por STR presente en este cromosoma. [95]

Los STRs del cromosoma X estudiados para usos forenses han presentado poder de discriminación entre 0.7 y 0.94 para los diferentes loci, con valores superiores en las mujeres.[96,97] El sistema DXS8377 presenta un poder de discriminación muy

[94]DESMARAIS D, et al. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). J Forensic Sci 1998; 43: p. 1047.
[95]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. Cit. p. 68.
[96]ALER M, SÁNCHEZ-DIZ P, Op. Cit. p. 10.023.

alto en población Taiwanesa,[98] al igual que en poblaciones afro americana, Asiática e hispana,[99] mientras que sistemas como DXS7424 han demostrado menos poder de discriminación en estas poblaciones.

2.4.2 Probabilidad de coincidencia (PC). Este es el concepto contrario al poder de discriminación y se define como la probabilidad de que un individuo analizado, coincida plenamente con otro tomado al azar de la población. Matemáticamente la probabilidad de coincidencia se calcula como: PC = 1-PD

2.4.3 Heterocigosidad (H). La heterocigosidad es un buen estimador de la variación genética, y la podemos establecer como heterocigosidad observada (Ho) y esperada (H_E).

La Ho. Se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquier loci y se calcula por conteo directo. Mientras que la $H_{E.}$ desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población, sean diferentes.[100] En una población en equilibrio de H-W, la frecuencia de heterocigotos esta dada por la ecuación 2pq. Matemáticamente la heterocigosidad se calcula como: $H_E = \sum pi\ (1-pi)$
Donde pi es la fecuencia de cada alelo.

2.4.4 Poder de exclusión (PE). La probabilidad de exclusión de un locus o un grupo de ellos se define como la capacidad que poseen de descartar como posible padre a un individuo tomado al azar de la población, dados una madre y un hijo en particular. Para los marcadores del cromosoma X, este se calcula según Desmarais. [101]

PE para cada sistema:

$PE\ (tríos) = 1-\sum pi^2 + \sum pi^4 - (\sum pi^2)^2$

$PE\ (dúos) = 1- 2(\sum pi^2) + \sum pi^3$

Donde pi es la frecuencia de cada alelo.

La probabilidad de exclusión que involucra un grupo de sistemas se calcula como:

$PE\ (total) = 1-[(1-PE_1)* (1-PE_2)* (1-PE_3)*(1-PE_n)]$

---

[97]POETSCH M, PETERSMANN H, REPENNING A, LIGNITZ E. Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. Forensic Sci Int 2005; 155:p.75.
[98]CHEN MY, PU CE. Op. Cit. p. 66.
[99]GOMES I, et al. Genetic analysis of three US population groups using an X-Chromosomal STR decaplex. Int J Legal Med 2006; DOI 10.1007/s00414-006-0146-2.
[100]GARCIA O. Parámetros en identificación forense y criminalística biológica. En: La prueba del AND en medicina forense. Barcelona: Masson, 1999. p. 288.
[101]SZIBOR R, Op. Cit. p.69.

La probabilidad de exclusión deseable es la máxima posible, La Internacional Society of Forensic Genetics del grupo español y portugués (ISFG-GEP) recomienda que la prueba utilizada en análisis de filiación supere el 99.99% de poder de exclusión a priori.

Debido a que el hombre es hemicigoto para el cromosoma X, la probabilidad de Exclusión de los marcadores del cromosoma X tiende a ser mayor que la calculada a partir de los loci STRs autonómicos,[102,103] favoreciendo así su uso en análisis de filiación de tríos donde se involucra un descendiente de género femenino.

2.5 BASE DE DATOS POBLACIONALES

Los primeros estudios sobre marcadores microsatélites del cromosoma X, se encaminaron a lograr la estandarización en la nomenclatura de los STRs,[104] a establecer la localización genética de los marcadores y a realizar la caracterización de haplotipos que pudieran contribuir a la reconstrucción de casos complejos. [105,106]

Cuando nuevos locus son introducidos en la práctica forense, un requisito básico consiste en realizar previamente un estudio en el grupo poblacional de referencia y establecer una base de datos con el fin de evaluar la eficiencias de estos marcadores y documentar la variación genética de estos sistemas entre la población mundial. [107]

Con esta población se debe determinar:

- El grado de variabilidad de los marcadores y la distribución de las frecuencias en dicha población, con el fin de evaluar el poder de discriminación de los marcadores.

- La proporción de genotipos en la población de referencia con el fin de evaluar si esa proporción es la que se esperaría asumiendo un cruzamiento al azar entre los individuos de la población.

- Equilibrio de ligamiento de los diferentes loci STRs en estudio.

- La homogeneidad de la población, o por el contrario determinar si esta compuesta de subpoblaciones con distinta distribución de las frecuencias alélicas.

[102]TURRINA S, Op. Cit. p. 303.
[103]Gomes I, Op. Cit. p. 10.1007.
[104]EDELMANN J, DEICHSEL D, Op. Cit. p. 101.
[105]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. Cit. p. 70.
[106]AUGUSTIN C, CICHY R, Op. Cit. p. 278.
[107]CERRI N, VERZELETTI A, Op. Cit. p. 286.

Los estudios poblacionales pretenden definir las poblaciones, a través de las frecuencias génicas de determinados polimorfismos, en este caso sistemas ubicados en el Cromosoma X y observar sus similitudes o diferencias mediante tests estadísticos, no obstante debe tenerse en cuenta que la fiabilidad de los resultados depende de las condiciones de la muestra poblacional. Actualmente, se han establecido las frecuencias alélicas y demás datos poblacionales de varios loci STRs del cromosoma X en diferentes grupos étnicos,[108,109,110] y la aparición de nuevos alelos para sistemas tales como DXS8378 y DXS7423 en algunas poblaciones permite hacer una mejor caracterización de las poblaciones y establecer diferencias entre ellas.[111,112]

Se han establecidos marcadas diferencias entre grupos poblacionales, al ser comparados con marcadores STRs del cromosoma X, lo cual sugiere que no es posible utilizar una base de datos general, por el contrario es relevante generar bases de datos particulares para la implementación del estos sistemas en dichas poblaciones. [113,114]

En Colombia se ha realizado un único estudio de tipificación de polimorfismos del cromosoma X en el departamento de Antioquia en el que se pudo establecer además de la distribución de las frecuencias, cual de los marcadores estudiados proporciona un mayor poder de discriminación, facilitando así la selección de marcadores candidatos a tipar para realizar los análisis de filiación en este departamento. [115]

Por ello es necesario realizar más estudios con el fin de estimar la distribución de las frecuencias alélicas en el resto de las poblaciones, y poder establecer diferencias genéticas entre ellas, calcular la tasa de mutación de los sistemas utilizados, conocer el desequilibrio de ligamiento de la población en particular, para establecer las bases de datos de referencia propias, que permitan la correcta utilización de estos marcadores en cada población. [116,117,118]

[108]OGUZTURUN C, Op. Cit. p. 284.
[109]EDELMANN J, Op. Cit. p. 216.
[110]BINI C, Op. Cit. p. 233.
[111]ALER M, SÁNCHEZ-DIZ P, Op. Cit. p. 10.023.
[112]GU S, LI S. X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population. Forensic Sci Int 2006; p. 73.
[113]ALER M, SÁNCHEZ-DIZ P, Op. Cit. p. 10.023.
[114]VERZELETTI A, CERRI N, Op. Cit. p. 11.001.
[115]MORENO MA, Op. cit. p. 297.
[116]BINI C, Op. cit. p. 235.
[117]MORENO MA, Op. cit. in press.
[118]GOMES I, Op. Cit. s00414-006-0146-2. p. 10.1007.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cómo está caracterizada genéticamente la población santandereana con respecto a los STRs del cromosoma X?

4. MATERIALES Y METODO

4.1 MUESTREO

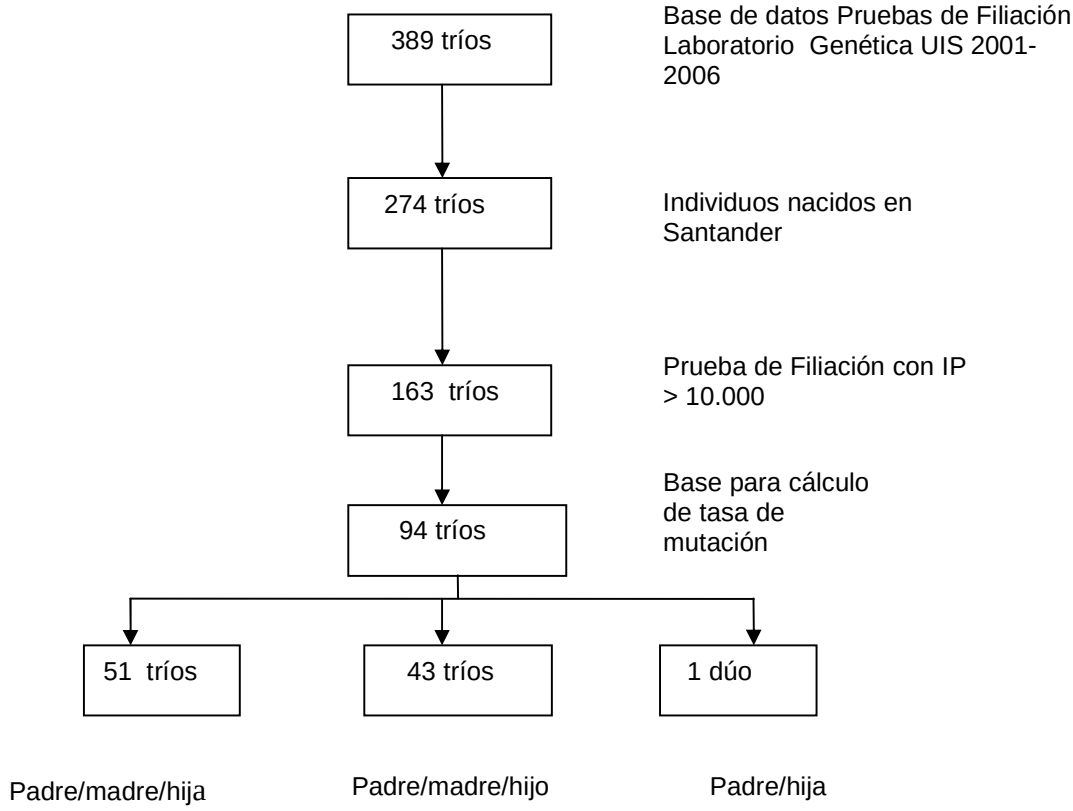
4.1.1. Individuos no relacionados. La muestra estuvo conformada por 218 individuos nacidos en Santander, seleccionados mediante muestreo de números aleatorios (Epi info ver. 6.04 2001) a partir de la base de datos de pruebas de filiación del laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander (UIS) generada desde el año 2001 hasta el año 2006. El número de muestras tomadas de cada municipio se calculó proporcionalmente al número de individuos reportados por el Departamento administrativo nacional de Estadística (DANE) en los diferentes municipios del departamento para el año 2005.

4.1.2 Individuos relacionados: grupo familiar. La muestra seleccionada correspondió a 94 tríos de los cuales 51 estaban conformados por padre-madre - hija y 43 tríos conformados por padre- madre - hijo y un dúo de padre –hija los cuales fueron seleccionados mediante muestreo de números aleatorios (epi info ver 6.04 2001) a partir de la base de datos de pruebas de filiación del Laboratorio de Genética de la Universidad Industrial de Santander (UIS) generada desde el año 2001 hasta el año 2006. El Cuadro 1 resume las condiciones del muestreo de estos individuos de una forma más detallada.

4.1.2.1 Criterios de exclusión. Se analizaron solo grupos familiares en los que se hubiese confirmado la filiación mediante el análisis de STRs autosómicos con valores de Indice de paternidad (IP) total superiores a 10.000.

4.1.3 Datos de los individuos. Se construyó una base de datos con información de los individuos, la identificación de los pacientes se hizo mediante la asignación de un código omitiendo el nombre para garantizar la confidencialidad de la información. La lista de nombres de los pacientes con sus respectivos códigos permanecen en el archivo del laboratorio de Genética de la Facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander, además de incluyo las variables de sexo, procedencia y edad al momento de la toma de la muestra.

Cuadro 1. Diagrama de selección de la muestra de individuos relacionados.



Fuente: Elaborado por el autor.

4.1.4 Aspectos éticos. Este estudio fue aprobado por el comité de ética en investigación de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Todos los individuos incluidos en el estudio aceptaron participar voluntariamente mediante la firma de un consentimiento informado por escrito, el cual fue diligenciado al momento de realizar la prueba de filiación (anexo A); donde dan su autorización para que la muestra almacenada en el laboratorio sea utilizada en estudios genéticos con marcadores STRs y para que los datos obtenidos a partir de este análisis puedan ser usados en la construcción de frecuencias poblacionales y demás parámetros estadísticos de importancia forense.

Este estudio fue de riesgo mínimo para el paciente, de acuerdo a la resolución 008430 de 1993 del ministerio de Salud que establece las normas éticas para la investigación en seres humanos.

4.2 PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

4.2.1 Toma de la muestra. A todos los individuos se les tomo una muestra de 5 ml de sangre venosa recolectada en tubo vacutainer con anticoagulante EDTA para la extracción de ADN, y adicionalmente se les tomo una muestra de sangre capilar recolectada en papel de filtro estéril como contra-muestra. Este procedimiento se llevo a cabo en el momento de realizarse la prueba de filiación, previa firma del consentimiento informado.

4.2.2 Extracción del ADN. La extracción del ADN se llevó a cabo por el método de Salting-out descrito por Miller et al. así: Se tomaron 3 ml de sangre anticoagulada y se colocaron en tubo de polipropileno de 15 ml, se le agregó 12 ml de buffer de lisis I (sucrosa 3M, Tris HCl 10mM pH 7.5, MgCl2 5mM y triton X-100 1%) para lisar los glóbulos rojos; se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 4ºC a 3500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y al botón de células nucleadas se le trató con 2.1 ml de buffer de lisis II (EDTA-Na 0.024M pH 8.0 y NaCl 50mM), 38 ul de SDS al 10% y 330 ul de perclorato de sodio 5M para romper membranas celulares y nucleares después de agitación con vortex. Se agregaron 600ul de NaCl 6M para precipitar proteínas, se agitó de nuevo y se centrifugó por 5 minutos a 4ºC y 3500 rpm. El sobrenadante que contiene el ADN en solución, se pasó a un nuevo tubo y se le agregó 2 ml de isopropanol para precipitar el ADN. El ADN se lavó con etanol frío al 70% y se conservó en 300 ul de solución hidratante: buffer TE (Tris HCl 10mM pH 7.5 y EDTA-Na 1mM), a –20ºC hasta su uso. La concentración de DNA se obtuvo mediante la medición de la absorbancia a 260 nm en un Spectronic Genesys 2 (Milton Roy company, Rochester, NY).

4.2.3 Genotipificación. La genotipificación se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la universidad Industrial de Santander, siguiendo los protocolos de las técnicas de biología molecular establecidos previamente por el grupo de cromosomas sexuales del grupo Español y Portugués de la International Society of forensic genetics (GEP-ISFG).

4.2.3.1 Selección de los loci. La selección de los 10 STRs ubicados en el cromosoma X se realizó con base en los reportes presentados en otras poblaciones, la selección hecha por el GEP-ISFG en los estudios colaborativos de STRs del X y por los laboratorios que participan en los ejercicios de Control de Calidad, lo cual sugiere que estos loci son altamente informativos y útiles en la investigación forense y el análisis poblacional.[119,120,121,122,123,124,125,126]

[119]SHIN KJ, KWON BK, Op. Cit. p. 38.
[120]ALER M, SÁNCHEZ-DIZ P, Op. Cit. p. 10.023.
[121]TURRINA S, ATZEI R, FILIPPINI G, DE LEO D. Op. cit. p. 01.007.
[122]GOMES I, et al. Op. cit. p. 01.001.
[123]VERZELETTI A, Op. cit. p. 11.001.
[124]POETSCH M, et al. Population data of 10 X-chromosomal loci in Latvia. FSI 2006; 157: p.206.
[125]QINGBO L, LI S. Patterns of genetic polymorphism at the 10 X-chromosome STR loci in Mongol population. FSI 2006; 158: p.77.
[126]TANG WM, TO KY. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. FSI 2006; 162: p.64.

Los sistemas seleccionados fueron:

DXS8378: Ubicado en la región Xp22, esta secuencia tiene un motivo de repetición tetranucleotídica (CTAT)n, se han reportados alelos del 8-14 en diferentes poblaciones con un tamaño de 110-134 pb. [127,128]

DXS9898: Ubicado en la región Xq21.33, presenta un motivo de repetición tetranucleotídica (TATC)n ATC (TATC)n. Estudios en diferentes poblaciones reportan alelos del 8-15 con un tamaño de 148 a 177 pb. [129,130]

DXS8377: Ubicado en Xq28, es un STR complejo cuya secuencia tiene motivos de repetición trinucleotídica (AGA)n (GGA-AGA)n (AGA)n-GGA-(AGA)n , se han reportados alelos del 33-60 con un tamaño entre 192 y 272 pb. [131,132,133]

HPRTB: Ubicado en Xq26.1, este sistema presenta una estructura tetranucleotídica (TCTA)n. En diferentes poblaciones se han reportado alelos del 9-19 con un tamaño de 267 a 309 pb. [134,135,136]

GATA172D05: Ubicado en Xq24, esta secuencia tiene un motivo de repetición tetranucleotídica (TAGA)n, se han reportados alelos del 5-12 en diferentes poblaciones con un tamaño de 104-132 pb. [137,138,139]

DXS7423: ubicado en Xq28, formado por un motivo tetranucleotidico (TCCA)n TCTGTCCT (TCCA)n, este sistema reporta alelos del 12-18 con un tamaño de 175 a 199 pb. [140,141]

DXS6809: Ubicado en Xq21.33, este sistema presenta una estructura compleja con repeticiones tetranucleotídicas (CTAT)n (ATCT)n N_9 (TATC)n-(ATCT)n se han reportados alelos del 27-40 en diferentes poblaciones con un tamaño de 230-282 pb. [142]

---

[127]EDELMANN J, Op. cit. p. 100.
[128]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. cit. p. 69.
[129]Ibid. p. 70.
[130]Hering S, Op. cit. p. 44.
[131]EDELMANN J, Op. Cit. p. 101.
[132]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. cit. p. 70.
[133]GOMES I, CARIACEDO A, AMORIN A, GUSMAO L. A multiplex PCR design for simultaneous genotyping of X chromosome short tandem repeat markers. Int. Congreso Series 2006; 1288: p. 314.
[134]GOMES I, Op. cit. P. 10.1007.
[135]GOMES I, CARIACEDO A, Op. cit. p. 314.
[136]Tabbada KA, et al. Development of a pentaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies. Forensic Sci Int 2005; 154: p. 177.
[137]SZIBOR R, KRAWCZAK M, Op. cit. p. 70.
[138]Shin KJ, Op. cit. p. 38.
[139]SZIBOR R, EDELMANN J, Op. cit. 39.
[140]SZIBOR, Op. cit. p. 68..
[141]GOMES I. Op. cit. p. 314.
[142]SZIBOR, Op. cit. p. 68.

DXS7132: Ubicado en Xq11, esta secuencia tiene un motivo de repetición tetranucleotídica (TCTA)n y se han reportados alelos del 8-19 en diferentes poblaciones con un tamaño de 110-134 pb. [143,144]

DXS101: Ubicado en la región Xq21.33-Xq22.3, es un STR de estructura trinucleotídica compuesta (CTT)n (ATT)n para la que se han reportado alelos del 14-32 con tamaños de 178 a 233 pb. [145,146,147]

DXS6789: Este sistema está ubicado en la región xq22.3, su motivo de repetición es $(TATG)_n$ $(TATC)_n$ y se encuentran descritos alelos del 14-25 en diferentes poblaciones con un tamaño de 154-198 pb. [148,149]

4.2.3.2 Amplificación. La amplificación de los 10 loci se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR multiplex).

El método de PCR desarrollado por Mullis en 1986 se fundamenta en una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa, que permite la amplificación o reproducción "in vitro" de grandes cantidades de una región particular de ADN, a partir de una pequeña cantidad original de ADN molde para lo que se requiere un par de cebadores o "primers", cuyas secuencias son complementarias a las regiones flanqueantes 5' y 3' del segmento que se desea amplificar.

En la PCR multiplex se involucra la adición de más de un par de primers permitiendo la amplificación simultánea de varios loci de microsatélites en una sola reacción. La identificación de los diferentes fragmentos se realiza mediante marcaje de los primers con diferentes fluorocromos lo cual permite una clara identificación de cada uno de los sistemas amplificados.

Para la PCR se utilizó un kit de PCR multiplex (Quiagen, Hilden, Alemania) y se realizó en un volumen final de reacción de 10 ul, que contenían 1ul de una mezcla de primers (DXS101 0.4 µM y para los demás sistemas 0.2 µM de cada uno), 1X de Master Mix multiplex de PCR(Quiagen) y 1-5 ng de templete de ADN. Las secuencias iniciadoras y el marcaje fluorescente de cada una, se describen en la Tabla 2.

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR Sistem 2400 (Perkin -Elmer Corp) bajo las condiciones de una denaturación inicial a 95 ºC por 15 minutos; 10 ciclos de: 94 ºC por 30 segundos; 60 ºC por 90 segundos; 72 ºC

[143]EDELMAN, Op. cit. p. 100.
[144]SZIBOR, Op. cit. p. 68.
[145]Ibid. p. 68.
[146]EDELMANN J, SZIBOR R. Op. cit. p. 301.
[147]GOMES I, CARIACEDO A, AMORIN A, GUSMAO L.Op. cit. p. 314.
[148]HERING S, KUHLISCH E, SZIBOR R. Op. cit. p. 44.
[149]BINI C, Op. cit. p. 233.

por 60 segundos; y 20 ciclos de: 94 ºC por 30 segundos; 58 ºC por 90 segundos; 72 ºC por 60 segundos y una extensión final de 72 ºC por 30 minutos. [150]

Con cada montaje de PCR se amplificó un control negativo y un control positivo de DNA de la línea celular 9947A cuyo perfil corresponde a un individuo de sexo femenino, el cual viene incluido en los kits comerciales de Promega Corporation (Madison, WI) como control positivo de PCR. [151]

Tabla 2. Secuencia y referencia de los primers, y su marcaje

MARCADOR	FLOROCROMO	SECUENCIA DE PRIMERS (5'-3')	REFERENCIA.
DXS8378	6-FAM	TTAGGCAACCCGGTGGTCC ACAAGAACGAAACTCCAACTC	Edelmann J et al 2002
DXS9898	6-FAM	CGAGCACACCTACAAAAGCTG TAGGCTCACCTCACTGAGCA	Gomes I et al 2006
DXS8377	6-FAM	ACCACTTCATGGCTTACCACAG TATGGACCTTTGGAAAGCTAG	Athanasiadou D et al 2003
HPRTB	6-FAM	CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGG ATGCCACAGATAATACACATCCCC	Athanasiadou D et al 2003
GATA172D05	VIC	TAGTGGTGATGGTTGCACAG ATAATTGAAAGCCCGGATTC	Edelmann J et al 2002
DXS7423	VIC	GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	Edelmann J et al 2002
DXS6809	VIC	TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC TGCTTTAGGCTGATGTGAGG	Gomes I et al 2006
DXS7132	NED	TCCCCTCTCATCTATCTGACTG CACTCCTGGTGCCAAACTCT	Gomes I et al 2006
DXS101	NED	ACTCTAAATCAGTCCAAATATCTCCCTT CAAATCACTCCATGGCACATGTAT	Athanasiadou D et al 2003
DXS6789	NED	CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG	Gomes I et al 2006

Fuente: Elaborado por el autor

La tabla presenta los primers utilizados para amplificar cada STRs con su respectivo marcaje fluorescente el cual permite diferenciarlos en una PCR multiplex. 6 FAM (fluorocromo azul), VIC (verde) , NED (amarillo)

4.2.3.3 Electroforesis capilar. La detección de los fragmentos amplificados se realizó mediante una electroforesis capilar en el Analizador genético ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems) de la siguiente manera:

Se mezcló 1 ul de amplificado con 13.4 ul de formamida y 0.6 ul del marcador interno ROX 500 (Applied Biosystems), las muestras preparadas se denaturaron a 95ºC por 3 minutos y se colocaron en hielo por 3 minutos más, con el fin de

[150]GOMES I, PRINZ M, PEREIRA R, MEYERS C, MIKULASOVICH RS, AMORIM A . Op. cit. p. 10.1007.
[151]GOMES I, CARRACEDO A, AMORIN A, GUSMAO L. Op. cit. p. 314.

mantener la denaturación. Se utilizó polímero POP 4 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) y las condiciones de corrida electroforética se establecieron con el filtro GS STR POP4 (1ml)F con una inyección de muestra de 7 segundos, temperatura de corrida de 60 ºC a 15.0 Kv por 24 min.

4.2.3.4 Asignación alélica. El tamaños de los fragmentos se determinó usando el sofware Genescan ver.2.1 Analysis (Applied Biosystems), inicialmente se confirmó la correcta asignación de los pesos moleculares para los fragmentos mostrados en el marcador interno ROX 500 presente en cada una de las muestras, posterior a esto se realizó la asignación alélica de los 10 marcadores analizados en cada individuo con base en la comparación con el ADN de referencia utilizado en la PCR, siguiendo la nomenclatura propuesta por Szibor.[152] La asignación alélica para el sistema HPRTB se realizó según la recomendación de Gomes y colaboradores, [153] ya que para este locus se consideró en la muestra de referencia un motivo de repetición TCTA adicional al reportado en la literatura y consecuentemente se gana una repetición extra.

Una vez hecha la genotipificación de los individuos se construyó la base de datos en una tabla de Exel® generada por duplicado y posterior a su comparación y corrección se procedió a crear nuevas bases de datos con la información pertinente a este estudio utilizando el programa Arlequín 3.0.[154] Con el fin de evaluar la confiabilidad de los resultados, se realizó un control externo mediante la tipificación con estos 10 marcadores en 4 muestras enviadas por el GEP-ISFG para el ejercicio de control de calidad del año 2006, y 3 muestras enviadas para el ejercicio del año 2007 en los que se presentó concordancia en las asignaciones alélicas.

4.2.4 Secuenciación. Esta técnica se aplicó a algunos individuos que presentaron discordancias entre los alelos observados en el hijo y los presentes en los padres, con el fin de confirmar la presencia de una mutación y de establecer la estructura de la mutación.

Las muestras fueron amplificadas únicamente para el sistema mutado utilizando primers no marcados. Los fragmentos amplificados fueron purificados en columnas Microspin S-300 HR (GE Healtheare, Amersham Place, UK) y la PCR de secuencia se llevo a cabo con el Kit de reacción ABI Big Dye Terminador (Applied Biosystems). Los productos de la secuenciación fueron visualizados mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) y los datos fueron analizados usando el sofware Analysis Sequencing 3.7 (Applied Biosystems).

---

[152]SZIBOR R, EDELMANN J, HERING S, PLATE I, WITTIG H, ROEWER L. et al. Op. Cit. p. 40.
[153]GOMES I, PRINZ M, PEREIRA R, MEYERS C, MIKULASOVICH RS, AMORIM A . Op. cit. p. 10.1007.
[154]EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 2005; 1: p.48.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.3.1 Cálculo de frecuencias genotípicas. Las frecuencias genotípicas se calcularon mediante conteo directo de cada genotipo tanto en hombres como en mujeres para cada uno de los loci tipificados.

4.3.2 Cálculo de frecuencias alélicas. Con los genotipos obtenidos se calcularon las frecuencias alélicas de los diferentes loci para hombres y para mujeres, las cuales se compararon mediante un test exacto de diferenciación, con el fin de establecer diferencias significativas entre las dos poblaciones, y a partir de estas se calcularon las frecuencias alélicas totales que corresponde al primer objetivo de este trabajo.

4.3.3 Test de equilibrio de Hardy Weinberg (HWE). Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg a partir de las frecuencias alélicas poblacionales para los diferentes loci, mediante una prueba de χ^2 (chi-cuadrado), [155] a través de la comparación de las frecuencias alélicas observadas y las esperadas en la población femenina estudiada, esta misma población se utilizo para determinar la heterozigocidad observada y estimar la heterozigocidad esperada con respecto a cada uno de los loci estudiados. Se utilizaron tablas para la descripción de los hallazgos.

4.3.4 Test de desequilibrio de ligamiento. Se realizó un test de desequilibrio de ligamiento entre todos los loci, con el fin de establecer si algunos de ellos tienden a segregarse juntos debido su ubicación en un mismo cromosoma.

Todos estos análisis fueron realizados a través del programa estadístico ARLEQUIN versión 3.0. [156]

4.3.5 Parámetros de interés forense. Con el fin de establecer la eficiencia estadística de cada loci, se calculó el poder de discriminación en mujeres y en hombres y la Probabilidad de Exclusión Apriori en los tríos formados por padre-madre-hija y en los dúos padre-hija; los cuales se realizaron siguiendo las fórmulas propuestas por Desmarais. [157]

Con base a el poder de discriminación obtenido en cada sistema se calculó el poder de coincidencia (PC) para todos los loci siguiendo la fórmula propuesta por Zarrabeitia. [158]

---

[155] EMERY AEH**.** Methodology in medical genetics. An Introduction to statistical Methods. Churchill Livingstone. London: Great Britain 1976. p. 7.
[156] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Op. cit. p. 1: p. 49.
[157] DESMARAIS D, et al. Op. cit. 43: p.1047.
[158] ZARRABEITIA, MT, et al. Análisis of six tetranucleotide polymorphisms of the X-chromosome in different Spanish regions. International Congress Series 2006; 1288: p. 305.

Para evaluar el poder de este decaplex se calculó el poder de discriminación y el poder de Exclusión combinado como $1-[(1-PD_1)*(1-PD_2)*(1-PD_3)*(1-PD_n)]$ y $1-[(1-PE_1)*(1-PE_2)*(1-PE_3)*(1-PE_n)]$ respectivamente. [159]

4.3.6 Comparación de las frecuencias alélicas de los marcadores STRs del cromosoma X entre la población santandereana y otras poblaciones. Adicionalmente, y con el fin de evaluar la afinidad genética con otras poblaciones con respecto a los marcadores estudiados, se compararon las frecuencias alélicas obtenidas en la población santandereana para cada uno de los loci con las informadas en la población Europea (España, Alemania), Afro americana e Hispana (grupos poblacionales de Estados Unidos) y con 3 poblaciones suramericanas (Argentina, Perú y Antioquia).

Las comparaciones se realizaron mediante un test de diferenciación bajo el estimador Rst excepto en el caso del sistema DXS9898 donde la presencia de alelos intermedios (alelo 8,3) dificulta el uso de este método y en cuyo caso la estimación se realizó mediante Fst basado en el número de diferencias alélicas.[160] Los cálculos se realizaron con el sofware ARLEQUIN version 3.0. [161]

4.4 TASA DE MUTACIÓN

4.4.1 Identificación de exclusiones. Se estableció la filiación entre los grupos familiares comparando los alelos heredados al hijo(a) por parte de la madre y del padre. En los casos en que el alelo presente en el hijo no estuvo en alguno de los progenitores, se consideró la probabilidad de una mutación.

4.4.2 Cálculo de la tasa de mutación. Se calculó la tasa de mutación general para todos los sistemas estudiados teniendo en cuenta el número de mutaciones encontradas en los 10 loci y el total de transmisiones alélicas evaluadas.

Se recopilaron las mutaciones presentes en los STRs del cromosoma X informadas en las diferentes poblaciones del mundo al igual que el número de transmisiones alélicas reportadas, con el fin de ajustar la tasa de mutación para cada uno de los loci. Los intervalos de confianza se establecieron en un 95% (P=0.05).

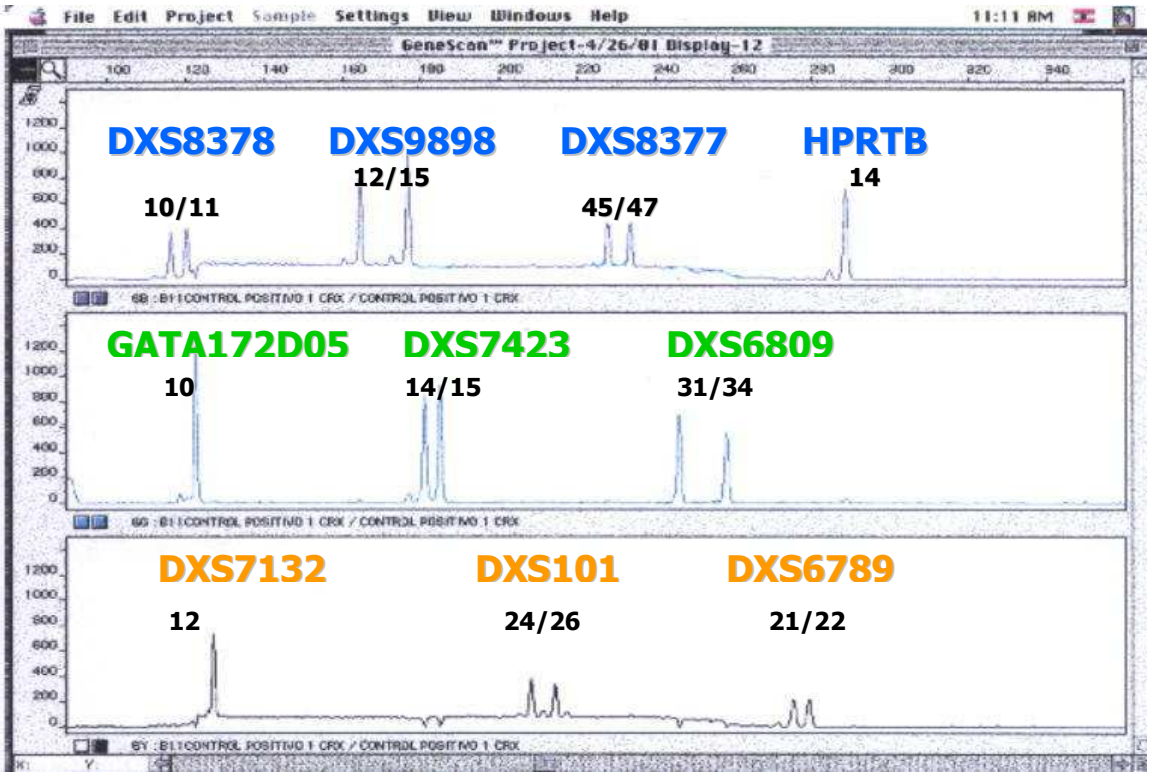
[159] POETSCH M, Op. cit. p. 155: p. 72.
[160] PEREIRA R, GOMES I, AMORIM A, GUSMÃO L. Genetic diversity of 10 X-chromosome STRs in northern Portugal. Int J Legal Med 2006; DOI 10.1007/s00414-006-0144-4
[161] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Op. cit. p. 1: p. 49

5. RESULTADOS

5.1ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS DEFINITIVA

Para resolver la pregunta de investigación propuesta en este proyecto se procedió a completar la base de datos en Exel® con la información genotípica de los individuos obtenida de la lectura de los electroferogramas (Figura 1). A partir de esta se crearon nuevas bases de datos con la información pertinente para cada uno de los análisis utilizando el programa Arlequín 3.0. El tamaño de la muestra fue de 218 distribuidas en 108 (49.5%) hombres y 110 (50.5%) mujeres.

Figura 1. Electroferograma de los 10 STRs tipificados en cada individuo



Fuente: Elaborado por el autor

Electroforesis capilar que presenta el genotipo de una muestra control para los 10 sistemas STRs que se tipificaron en cada individuo. Los picos corresponden a los alelos presentes en cada sistema tipado y los colores hacen referencia al fluorocromo con el cual estan marcados 6-FAM (azul), VIC (verde) y NED (amarillo).

5.2 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

Las frecuencias calculadas para cada uno de los genotipos hallados en mujeres y en hombres se presentan en la Tabla 3 y 4 respectivamente.

En las mujeres en la mayoría de los sistemas los genotipos homocigotos son menos frecuentes que los heterocigotos, sin embargo el genotipo 15 para el sistema DXS7423 presenta una frecuencia muy elevada en esta población (0.273) al igual que el genotipo 10 y 20 para los sistemas DXS8378 y DXS6789 los cuales presentan frecuencias de 0.264 y 0.246 respectivamente. En esta misma población predomina el genotipo 12/13 (0.291) para el sistema DXS9898.

En el sistema DXS8378 de los 19 genotipos encontrados, 3 (10,10/11 y 10/12) están presentes en el 73% de la población femenina analizada con frecuencias de 0.264, 0.236 y 0.227 respectivamente, mientras los demás presentan frecuencias menores de 0.119.

En la población masculina la condición de hemicigosidad ocasiona la presencia de un solo alelo para cada loci. El sistema DXS8378 presenta solo 3 genotipos en esta población. En algunos sistemas no se presenta una distribución muy homogénea de las frecuencias genotípicas, esto se evidencia en el DXS6789 donde se encontró 11 genotipos de los cuales solo dos de estos, el 20 y el 21 están presentes en el 70% de la población, con una frecuencia de 0.500 y 0.213 respectivamente. Un caso similar se presenta con el sistema DXS9898 donde el 65% de esta población presenta el genotipo 12 (0.269) ó 13 (0.389), y en el GATA172D05 se hallaron 9 genotipos, pero el 42% de los hombres poseen el genotipo 10.

Contrario a esto, en el sistema DXS8377 además de encontrarse un gran número de genotipos (15), todos presentan frecuencias menores de 0.140.

Tabla 3. Frecuencias Genotípicas de la población femenina de Santander

GENOTIPO	GATA172D05	GENOTIPO	HPRTB	GENOTIPO	DXS101
6-8	0,055	11-13	0,009	15-24	0,009
6-9	0,009	11-15	0,009	16-21	0,009
6-10	0,082	12-13	0,064	18-18	0,009
6-11	0,055	12-14	0,036	18-27	0,018
6-12	0,036	12-15	0,064	19-21	0,009
8-8	0,036	12-16	0,009	19-23	0,009
8-9	0,009	13-13	0,055	19-25	0,009
8-10	0,127	13-14	0,127	19-26	0,018
8-11	0,064	13-15	0,073	19-27	0,009
8-12	0,009	13-16	0,027	20-25	0,009
8-13	0,018	13-17	0,009	20-26	0,009
9-9	0,018	13-18	0,009	21-24	0,018
9-10	0,036	14-14	0,136	21-25	0,009
9-11	0,018	14-15	0,200	22-25	0,009
9-12	0,027	14-16	0,064	22-26	0,027
10-10	0,064	14-18	0,009	23-23	0,027
10-11	0,127	15-15	0,046	23-24	0,055
10-12	0,064	15-16	0,018	23-25	0,009
10-14	0,009	15-17	0,009	23-26	0,027
11-11	0,036	16-16	0,018	23-27	0,009
11-12	0,073	16-18	0,009	23-28	0,018
12-12	0,027			24-24	0,136
				24-25	0,100
GENOTIPO	**DXS9898**	**GENOTIPO**	**DXS7423**	24-26	0,091
8,3-8,3	0,009	13-14	0,036	24-27	0,055
8,3-11	0,027	13-15	0,073	24-28	0,027
8,3-12	0,073	14-14	0,091	24-29	0,009
8,3-13	0,055	14-15	0,209	24-30	0,009
10-11	0,009	14-16	0,064	25-25	0,027
10-13	0,009	14-17	0,073	25-26	0,036
11-12	0,027	15-15	0,273	25-27	0,055
11-13	0,073	15-16	0,082	25-28	0,018
11-14	0,009	15-17	0,064	25-29	0,009
12-12	0,136	16-16	0,009	26-26	0,036
12-13	0,291	16-17	0,009	26-27	0,036
12-14	0,046	17-17	0,018	26-28	0,027
13-13	0,146				
13-14	0,073				
13-15	0,009				
14-14	0,009				

Fuente: Elaborado por el autor

La tabla presenta la distribución de las frecuencias de los diferentes genotipos encontrados en cada uno de los STRs tipificados en la población femenina de Santander. El color con que se identifica el sistema STRs corresponde al color emitido por el fluorocromo.

Tabla 3. (cont.). Frecuencias Genotípicas de la población femenina de Santander

GENOTIPO	DXS8377	GENOTIPO	DXS8377	GENOTIPO	DXS7132
39-42	0,009	46-51	0,027	12-12	0,009
40-47	0,009	46-54	0,009	12-13	0,027
40-50	0,018	46-58	0,009	12-14	0,027
41-43	0,009	47-47	0,009	12-15	0,036
41-44	0,009	47-48	0,027	12-16	0,009
41-46	0,009	47-49	0,027	12-17	0,009
41-48	0,018	47-50	0,009	13-13	0,064
41-49	0,009	47-52	0,009	13-14	0,164
42-42	0,009	47-53	0,009	13-15	0,082
42-43	0,009	47-54	0,009	13-16	0,027
42-46	0,009	48-49	0,009	13-17	0,009
42-47	0,027	48-50	0,009	13-18	0,018
42-48	0,009	48-51	0,009	14-14	0,127
42-49	0,009	48-52	0,018	14-15	0,100
42-51	0,009	48-53	0,018	14-16	0,046
43-44	0,018	48-54	0,009	14-17	0,082
43-46	0,009	48-50	0,018	14-18	0,009
43-47	0,009	49-51	0,018	15-15	0,046
43-49	0,009	49-53	0,018	15-16	0,036
43-51	0,018	49-54	0,009	15-17	0,027
44-44	0,009	50-51	0,018	16-16	0,009
44-46	0,027	50-52	0,009	16-17	0,018
44-47	0,018	51-54	0,018	17-17	0,009
44-48	0,018	52-53	0,018	19-19	0,009
44-49	0,027				
44-50	0,009				
44-52	0,009				
44-53	0,009				
44-54	0,009				
45-45	0,009				
45-46	0,036				
45-47	0,045				
45-48	0,027				
45-50	0,018				
45-53	0,009				
45-55	0,009				
46-47	0,046				
46-48	0,018				
46-49	0,027				
46-50	0,036				

Fuente: Elaborado por el autor

La tabla presenta la distribución de las frecuencias de los diferentes genotipos encontrados en cada uno de los STRs tipificados en la población femenina de Santander. El color con que se identifica el sistema STRs corresponde al color emitido por el fluorocromo.

Tabla 3. (cont.). Frecuencias Genotípicas de la población femenina de Santander

GENOTIPO	DXS8378	GENOTIPO	DXS6809	GENOTIPO	DXS6789
10-10	0,264	28-30	0,009	15-15	0,009
10-11	0,236	28-31	0,009	15-16	0,018
10-14	0,009	28-33	0,009	15-20	0,036
10-12	0,227	29-33	0,018	15-21	0,009
11-11	0,091	30-31	0,009	16-16	0,036
11-12	0,118	30-32	0,027	16-20	0,109
11-13	0,009	30-33	0,018	16-21	0,064
12-12	0,046	30-34	0,018	16-23	0,009
		30-36	0,009	16-24	0,009
		31-31	0,009	17-20	0,009
		31-32	0,018	19-20	0,064
		31-33	0,036	19-21	0,027
		31-34	0,036	19-22	0,036
		31-35	0,027	20-20	0,246
		32-32	0,027	20-21	0,109
		32-33	0,118	20-22	0,100
		32-34	0,064	20-23	0,009
		32-36	0,009	21-21	0,027
		32-37	0,009	21-22	0,018
		33-33	0,118	21-23	0,027
		33-34	0,200	22-22	0,018
		33-35	0,018		
		33-36	0,009		
		33-37	0,009		
		34-34	0,109		
		34-35	0,027		
		34-36	0,027		

Fuente: Elaborado por el autor

La tabla presenta la distribución de las frecuencias de los diferentes genotipos encontrados en cada uno de los STRs tipificados en la población femenina de Santander. El color con que se identifica el sistema STRs corresponde al color emitido por el fluorocromo.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas de la población masculina del departamento de Santander

DXS8378		DXS7423		DXS9898		HPRTB	
Genotipo	**Frecuencia**	**Genotipo**	**Frecuencia**	**Genotipo**	**Frecuencia**	**Genotipo**	**frecuencia**
10	0,444	13	0,019	7	0,009	11	0,000
11	0,306	14	0,306	8,3	0,157	12	0,102
12	0,250	15	0,389	10	0,019	13	0,269
13	0,000	16	0,065	11	0,074	14	0,315
14	0,000	17	0,222	12	0,269	15	0,241
				13	0,389	16	0,065
				14	0,083	17	0,009
				15	0,000	18	0,000

GATA172D05		DXS6789		DXS101		DXS8377	
6	0,093	15	0,028	15	0,000	39	0,009
7	0,009	16	0,093	16	0,009	40	0,000
8	0,176	17	0,009	18	0,019	41	0,046
9	0,056	18	0,009	19	0,019	42	0,046
10	0,417	19	0,028	20	0,000	43	0,056
11	0,130	20	0,500	21	0,046	4	0,102
12	0,120	21	0,213	22	0,019	45	0,093
13	0,000	22	0,093	23	0,046	46	0,139
14	0,000	23	0,028	24	0,278	47	0,093
		24	0,000	25	0,157	48	0,074
		25	0,000	26	0,176	49	0,139
				27	0,111	50	0,130
DXS7132		DXS6809		28	0,056	51	0,037
11	0,019	28	0,009	29	0,056	52	0,000
12	0,074	29	0,000	30	0,009	53	0,009
13	0,241	30	0,019			54	0,019
14	0,287	31	0,120			55	0,000
15	0,213	32	0,222			56	0,009
16	0,093	33	0,315				
17	0,046	34	0,222				
18	0,019	35	0,065				
19	0,009	36	0,009				
		37	0,019				

Fuente: Elaborado por el autor

La tabla presenta la distribución de las frecuencias de los diferentes genotipos encontrados en cada uno de los STRs tipificados en la población masculina de Santander. El color con que se identifica el sistema STRs corresponde al color emitido por el fluorocromo.

5.3 FRECUENCIAS ALÉLICAS

La distribución de las frecuencias alélicas observadas para cada uno de los loci estudiado en las muestras de hombres y en mujeres se compararon mediante un test exacto de diferenciación, los resultados de dicha comparación se observan en la Tabla 5, los valores de p se encontraron entre 0.0134±0.0018 para el sistema DXS7423 y 0.8576±0.0103 para el sistema HPRTB.

Tabla 5. Test de diferenciación entre frecuencias alélicas de la población masculina y Femenina

MARCADOR	Rst	VALOR p (Rst)	TEST EXACTO DE DIFERENCIACIÓN VALOR p
DXS8378	-0.0043	0.5674+-0.0047	0.8173+-0.0059
DXS7132	-0.0036	0.4898+-0.0048	0.5738+-0.0192
DXS9898	0.0026	0.2317+-0.0043	0.2626+-0.0138
DXS6809	-0,0063	0.7736+-0.0040	0.3211+-0.0160
DXS6789	0,0036	0.2235+-0.0039	0.6137+-0.0150
DXS101	0,0095	0.1280+-0.0032	0.5246+-0.0201
GATA172D05	-0,0065	0.8190+-0.0037	0.2530+-0.0141
HPRTB	-0,0003	0.3478+-0.0050	0.8576+-0.0103
DXS8377	0,0025	0.2507+-0.0035	0.4209+-0.0209
DXS7423	0,0315	0.0203+-0.0015	0.0134+-0.0018

Fuente: Elaborado por el autor

La tabla presenta la diferencia en la distribución de las frecuencias alelicas de las mujeres con respecto a los hombres mediante el cálculo de distancia génica (Rst) y el test exacto de diferenciación.

En los 10 sistemas comparados entre los subgrupos de hombres y mujeres, no se encontraron diferencias significativas, excepto en el loci DXS7423 (p=0.0134) al cual se le realizó la corrección de Bonferroni para múltiples test (Nivel de significancia de 0.005). Con estos resultados se procedió a mezclar los dos grupos de individuos y a partir de ellos se calculó las frecuencias alélicas poblacionales totales para cada uno de los loci las cuales se presentan en la Tabla 6.

En el sistema DXS8378 se identificaron alelos del 10 al 14 con pesos de 116 a 132 pb, siendo el alelo 10 el más frecuente en la población (0.4817) y solo el 0.6% de la población presenta el alelo 13 (0.0031) ó 14 (0.0031).

Para el sistema DXS7132 los alelos del 11 al 19 con pesos de 123 a 155 pb se identificaron en la población santandereana. El alelo 14 es el más frecuente

Tabla 6. Frecuencias alelicas para 10 sistemas STRs del cromosoma X en una muestra poblacional de Santander.

ALELO	DXS7132	DS	ALELO	GATA172D05	DS	ALELO	DXS8377	DS
11	0.0061	0.0043	**6**	0.1098	0.0172	**39**	0.0061	0.0043
12	0.0671	0.0138	**7**	0.0031	0.0030	**40**	0.0092	0.0052
13	0.2317	0.0233	**8**	0.1768	0.0210	**41**	0.0335	0.0099
14	0.3232	0.0258	**9**	0.0640	0.0135	**42**	0.0488	0.0119
15	0.1951	0.0219	**10**	0.3293	0.0259	**43**	0.0457	0.0115
16	0.0823	0.0151	**11**	0.1799	0.0212	**44**	0.0915	0.0159
17	0.0701	0.0141	**12**	0.1281	0.0184	**45**	0.0854	0.0154
18	0.0152	0.0067	**13**	0.0061	0.0043	**46**	0.1342	0.0188
19	0.0092	0.0052	**14**	0.0031	0.0030	**47**	0.1189	0.0178
						48	0.0884	0.0157
	HPRTB			**DXS9898**		**49**	0.1067	0.0170
11	0.0061	0.0043	**7**	0.0031	0.0030	**50**	0.0915	0.0159
12	0.0915	0.0159	**8.3**	0.1098	0.0172	**51**	0.0518	0.0122
13	0.2317	0.0233	**10**	0.0122	0.0060	**52**	0.0213	0.0079
14	0.3415	0.0262	**11**	0.0732	0.0144	**53**	0.0305	0.0095
15	0.2348	0.0234	**12**	0.3293	0.0259	**54**	0.0274	0.0090
16	0.0762	0.0146	**13**	0.3933	0.0270	**55**	0.0031	0.0030
17	0.0092	0.0052	**14**	0.0762	0.0146	**56**	0.0031	0.0030
18	0.0092	0.0052	**15**	0.0031	0.0030	**58**	0.0031	0.0030
	DXS6809			**DXS6789**			**DXS101**	
28	0.0122	0.0060	**15**	0.0366	0.0103	**15**	0.0031	0.0030
29	0.0061	0.0043	**16**	0.1250	0.0182	**16**	0.0061	0.0043
30	0.0366	0.0103	**17**	0.0061	0.0043	**18**	0.0183	0.0074
31	0.0915	0.0159	**18**	0.0031	0.0030	**19**	0.0243	0.0085
32	0.1738	0.0209	**19**	0.0518	0.0122	**20**	0.0061	0.0043
33	0.3293	0.0259	**20**	0.4756	0.0276	**21**	0.0305	0.0095
34	0.2713	0.0245	**21**	0.1768	0.0210	**22**	0.0183	0.0074
35	0.0457	0.0115	**22**	0.0945	0.0161	**23**	0.0762	0.0146
36	0.0213	0.0079	**23**	0.0244	0.0085	**24**	0.3079	0.0255
37	0.0122	0.0060	**24**	0.0031	0.0030	**25**	0.1585	0.0201
			25	0.0031	0.0030	**26**	0.1738	0.0209
						27	0.0976	0.0164
	DXS7423			**DXS8378**		**28**	0.0488	0.0119
13	0.0427	0.0111	**10**	0.4817	0.0276	**29**	0.0244	0.0085
14	0.2896	0.0250	**11**	0.2805	0.0248	**30**	0.0061	0.0043
15	0.4543	0.0275	**12**	0.2317	0.0233			
16	0.0793	0.0149	**13**	0.0031	0.0030			
17	0.1342	0.0188	**14**	0.0031	0.0030			

DS: desviación estándar
Fuente: elaborado por el autor.

La tabla presenta los diferentes alelos encontrados en cada uno de los STRs tipificados en la población santandereana y la distribución de las frecuencias para estos alelos. Los colores representan el fluorocromo con el cual cada STR esta marcado

(0.3232) seguido del alelo 13 (0.2317), y contrario a esto los alelos 11 y 19 tienen una baja frecuencia con 0.0061 y 0.0092 respectivamente.

En el DXS9898 alelos del 7 al 15 fueron tipificados con tamaños entre 143 y 177 pb, un alelo intermedio (8.3) ya reportado en la literatura se encontró con una frecuencia de 0.1098. Los alelos 12 y 13 presentaron las frecuencias más altas 0.3293 y 0.3933 respectivamente mientras que los alelos 7 y 15 son muy poco frecuentes en esta población (0.0031).

En el sistema DXS6809 se hallaron alelos del 28 al 37 con pesos de 234-270 pb, los alelos 33 y 34 son los más frecuentes con frecuencias de 0.3293 y 0.2713 respectivamente, el menos frecuente corresponde al alelo 29 con una frecuencia de 0.0061.

En el sistema DXS6789 se hallaron fragmentos con pesos de 251 a 291 pb que corresponden a los alelos 15 al 25, el alelo 20 se encontró en la población estudiada con una muy alta frecuencias (0.4756), los demás alelos presentan frecuencias < a 0.17 destacando el 18, 24 y 25 los cuales son muy escasos en la población (0.0031).

Quince alelos (15-30) con tamaños entre 181 y 227 pb correspondientes al DXS101 se encontraron en la población santandereana estudiada, el alelo 24 es el más frecuente (0.3079) mientras que el alelo 15 presenta una frecuencia muy baja (0.0031).

En el sistema GATA172D05 se encontraron alelos desde el 6 con 106 pb al 14 con 139 pb. La frecuencia más alta se encontró con el alelo 10 (0.3293) y la más baja en los alelos 13 y 14 con una frecuencia de 0.0061 y 0.0031 respectivamente.

El locus HPRTB presentó alelos del 11 al 18 con pesos de 276 a 304 pb, siendo los más frecuentes los alelos 13,14 y 15 con frecuencias de 0.2317, 0.3415 y 0.2348 respectivamente; y el alelo que presentó la frecuencia más baja para este sistema (0.0061),correspondió al alelo 11.

En el sistema DXS 8377 se hallaron 19 alelos con pesos entre 210 y 254 pb. Se evidenció una distribución homogénea de las frecuencias entre los alelos del 39 al 54, sin embargo los alelos 55 al 58 presentaron la frecuencia más baja en esta población (0.0031).

Para el sistema DXS7423 se encontraron alelos del 13 al 17 con pesos de 117 a 193 pb, alrededor de la mitad de la población posee el alelo 15 (0.4543) y un cuarto de esta el alelo 14 (0.29), entre los 3 alelos restantes las frecuencias alélicas se distribuyen de una forma más homogénea.

5.4 EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG (HWE)

Los valores de heterocigosidad observadas y esperadas de cada loci y el test exacto de HWE calculados a partir de la muestra femenina, se presentan en la Tabla 7, donde se observa que los valores de p reportados para los 10 STRs se encuentran entre 0.0824 a 0.8285 lo cual indica que las frecuencias alélicas de todos los sistemas en la población se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 7. Test de Equilibrio de Hardy –Weinberg.

LOCI	HET Obs	HET Esp	HWE TEST EXACTO
DXS8378	0.6091	0.6313	0.8285 ±0.0005
DXS7132	0.7273	0.7840	0.3699 ±0.0006
DXS9898	0.6909	0.6997	0.5865 ±0.0048
DXS6809	0.7364	0.7701	0.5075 ±0.0006
DXS6789	0.6636	0.7320	0.0824 ±0.0004
DXS101	0.7636	0.8274	0.1746 ±0.0003
GATA172D05	0.8182	0.8123	0.3771 ±0.0005
HPRTB	0.7455	0.7692	0.4283 ±0.0005
DXS8377	0.9636	0.9203	0.7571 ±0.0005
DXS7423	0.6091	0.6728	0.4178 ±0.0007

HET Obs: Heterocigosidad observada. HET Esp: Heterocigosidad esperada. HWE TEST EXACTO: Valores de P para test de HWE.

Fuente: elaborado por el autor.

5.5 ANALISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

A partir de los genotipos de los hombres, se calculó el desequilibrio de ligamiento para todos los loci, los resultados se presentan en la Tabla 8. Se encontraron valores de p menores de 5% en 3 de los 45 comparaciones (p= 0.0069 entre DXS 8378 y DXS101, p=0.0264 entre DXS7132 y DXS6809 y p=0.0060 entre DXS101 y DXS9898). Sin embargo todos los test realizados presentaron valores de p superiores a 0.0011, después de aplicada la corrección de Bonferroni.

Tabla 8. Test de desequilibrio de ligamiento

PAR-LOCI	VALOR p	PAR-LOCI	VALOR p
GATA172D05/ DXS8378	0.9698 +- 0.0014	DXS8378/ DXS6809	0.5799 +- 0.0043
GATA172D05/ DXS7132	0.8390 +- 0.0025	DXS7132/ DXS6809	0.0264 +- 0.0011*
DXS8378/ DXS7132	0.3156 +- 0.0020	DXS9898/ DXS6809	0.2278 +- 0.0019
GATA172D05/ DXS9898	0.8199 +- 0.0026	DXS7423/ DXS6809	0.3199 +- 0.0021
DXS8378/ DXS9898	0.2805 +- 0.0022	DXS101/ DXS6809	0.5787 +- 0.0018
DXS7132/ DXS9898	0.1207 +- 0.0019	DXS8377/ DXS6809	0.4495 +- 0.0016
GATA172D05/ DXS7423	0.7730 +- 0.0041	GATA172D05/ DXS6789	0.3618 +- 0.0025
DXS8378/ DXS7423	0.7555 +- 0.0035	DXS8378/ DXS6789	0.1622 +- 0.0024
DXS7132/ DXS7423	0.7336 +- 0.0032	DXS7132/ DXS6789	0.3194 +- 0.0032
DXS9898/ DXS7423	0.9599 +- 0.0017	DXS9898/ DXS6789	0.2022 +- 0.0029
GATA172D05/ DXS101	0.1308 +- 0.0017	DXS7423/ DXS6789	0.5581 +- 0.0031
DXS8378/ DXS101	0.0069 +- 0.0008**	DXS101/ DXS6789	0.3663 +- 0.0018
DXS7132/ DXS101	0.2201 +- 0.0016	DXS8377/ DXS6789	0.4889 +- 0.0016
DXS9898/ DXS101	0.0060 +- 0.0010 *	DXS6809/ DXS6789	0.1390 +- 0.0025
DXS7423/ DXS101	0.9437 +- 0.0013	GATA172D05/ HPRTB	0.5508 +- 0.0027
GATA172D05/ DXS8377	0.0500 +- 0.0011	DXS8378/ HPRTB	0.7590 +- 0.0043
DXS8378/ DXS8377	0.5201 +- 0.0051	DXS7132/ HPRTB	0.1713 +- 0.0017
DXS7132/ DXS8377	0.7528 +- 0.0015	DXS9898/ HPRTB	0.4678 +- 0.0044
DXS9898/ DXS8377	0.3948 +- 0.0018	DXS7423/ HPRTB	0.1201 +- 0.0021
DXS7423/ DXS8377	0.0555 +- 0.0019	DXS101/ HPRTB	0.6157 +- 0.0030
DXS101/ DXS8377	0.0547 +- 0.0010	DXS8377/ HPRTB	0.2315 +- 0.0033
GATA172D05/ DXS6809	0.2084 +- 0.0018	DXS6809/ HPRTB	0.2814 +- 0.0028
		DXS6789/ HPRTB	0.9221 +- 0.0013

Valores de p significativos

Fuente: elaborado por el autor.

En la tabla se apreciar los valores de p para cada una de las parejas de loci en las que se evaluo el desequilibrio de ligamiento.

5.6 PARAMETROS DE EFICIENCIA FORENSE

A partir de la distribución de las frecuencias alélicas totales, se calcularon los parámetros estadísticos de eficiencia forense para cada locus en la muestra de Santander, los cuales son presentados en la Tabla 9.

Todos los loci analizados revelaron ser altamente polimórficos. El poder de discriminación para los sistemas analizados varió entre 0.6356 y 0.9141 en los hombres y 0.7973 a 0.9862 en las mujeres.

El DXS8377 es el sistema más polimórfico en la población santandereana, seguido del DXS101.

El locus menos discriminativo en esta población fue el DXS8378 con un poder de discriminación de 0.6356 en los hombres y 0.7973 en las mujeres.

El poder de discriminación combinado alcanzó un valor de 99.99997% en la población masculina y 99.999999999% en la población femenina.

El poder de exclusión Media a priori para tríos fue de 99.9999% mientras que para los dúos se calculó en 99.993%. El sistema DXS8377 presenta el mayor poder de exclusión siendo superior en los tríos (0.9076) que en los dúos (0.8368), seguido del sistema DXS101; mientras el DXS8378 posee el menor poder de exclusión para las dos situaciones en la población analizada (0.4174 y 0.5657)

Tabla 9. Parámetros de interés forense

LOCUS	PE_T	PE_D	PD_H	PC_H	PD_M	PC_M
DXS8378	0.5657	0.4174	0.6356	0.3641	0.7973	0.2027
DXS7132	0.7573	0.6293	0.7873	0.2127	0.9248	0.0752
DXS9898	0.6673	0.5257	0.7135	0.2865	0.8718	0.1282
DXS6809	0.7428	0.6122	0.7752	0.2248	0.9171	0.0829
DXS6789	0.6836	0.5427	0.7133	0.2867	0.8881	0.1119
DXS101	0.8107	0.6985	0.8292	0.1708	0.9523	0.0477
GATA172D05	0.7677	0.6414	0.7953	0.2047	0.9304	0.0696
HPRTB	0.7224	0.5868	0.7602	0.2398	0.9046	0.0954
DXS8377	0.9076	0.8368	0.9141	0.0859	0.9862	0.0138
DXS7423	0.6336	0.4883	0.6837	0.3163	0.8498	0.1502
Combinada %	**99.99990**	**99.993**	**99.99997**	**0.00003**	**99.9999999990**	**0.000000001**

PE_T: Probabilidad de exclusion apriori en trios involucrando hijas. PE_D: Probabilidad de exclusion apriori en duos madre/hijo. PD_H: poder de discriminación en hombres. PC_H: poder de coincidencia en hombres. PD_M: poder de discriminación en mujeres. PC_M: poder de coincidencia en mujeres.

Fuente: elaborado por el autor.

5.7 COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN ALELICA DE LOS MARCADORES STRs DEL CROMOSOMA X EN SANTANDER CON OTRAS POBLACIONES

La distribución de las frecuencias alélicas en la muestra de la población santandereana estudiada fue comparada con datos disponibles de los mismos marcadores estudiados en cinco poblaciones que corresponden a: Argentina,[162] Perú,[163] Antioquia[164], muestras de afro americanos e hispanos que viven en New York[165] al igual que con una muestra poblacional alemana[166] y una española[167].

La diferenciación entre las poblaciones fue calculada para cada uno de los sistemas comparados mediante el estimador Rst, cuyos resusltados se presentan en la Tabla 10.

En la comparación con la muestra de España, no se aprecian diferencias significativas en los sistemas GATA172D05 (p=0.023) y DXS7423 (p=0.028), sin embargo se observa una moderada diferenciación genética en los demás sistemas.

En los sistemas DXS7132, GATA172DO5 y HPRTB se obseva una alta diferenciación genética al realizar la comparación con la población alemana y de los sistemas GATA172DO5 (p=0.000) y DXS7423 al ser comparados con la población afroamericana en donde además no se encontró diferencias significativas en el sistema HPRTB (p=0.321).

La población hispana no presento diferencias genéticas significativas en la mayoría de los sistemas analizados después de realizar la corrección de Bonferroni para múltiples test, excepto en DXS9898 (p= 0.000) y DXS101 (p= 0.001) en donde se apreció moderada diferencia genética.

Aunque la disponibilidad de datos de poblaciones de Suramérica fue escasa, en las pocas comparaciones se observó una baja diferencia genética con la población santandereana.

[162]GANGITANO DA, et al. Distribution of HumHPRTB and HumF13A01 alleles in Buenos Aires Population (Argentina). J Forensic Sci 2001; 46: p. 418.
[163]EDELMANN J, et al. R. Op. cit. p. 265.
[164]MORENO MA, Op. cit. p. 296.
[165]GOMES I, et al. Op. cit. p. 10.1007.
[166]POETSCH M, PETERSMANN H, REPENNING A, LIGNITZ E. Op. cit. p. 75.
[167]ALER M, et al. Op. cit. p.10.023.

Tabla 10. Diferenciación Genética para los 10 sistemas STRs del cromosoma X entre la población de Santander y otras poblaciones

SISTEMAS	ESPAÑA	ALEMANIA	AFRO AMERICANA	HISPANICA	ARGENTINA	PERU	ANTIOQUIA
DXS8378	0.045*	0.020	0.082*	0.016			
	0.000+-0.000	0.007+-0.001	0.000+-0.000	0.043+-0.002			
DXS7132	0.097*	0.689*	0.037*	0.014			
	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.005+-0.001	0.055+-0.002			
DXS9898	0.049*	0.042*	0.040*	0.032*			
	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.000+-0.000			
DXS6809	0.011*	0.014	0.022*	0.001		0.010	
	0.002+-0.001	0.006+-0.001	0.000+-0.000	0.266+-0.004		0.026+-0.001	
DXS6789	0.132*	0.012*	0.042*	-0.001		-0.004	
	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.003+-0.001	0.352+-0.005		0.609+-0.005	
DXS101	0.028*	0.017	0.092*	0.049*			
	0.001+-0.000	0.013+-0.001	0.000+-0.000	0.001+-0.000			
GATA172D05	0.013	0.158*	0.211*	0.018		-0.001	
	0.023+-0.002	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.035+-0.002		0.396+-0.005	
HPRTB	0.040*	0.370*	0.001	0.006	0.005		
	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.321+-0.004	0.144+-0.004	0.157+-0.003		
DXS8377	0.029*	0.016	0.043*	0.011		-0.005	0.001
	0.002+-0.000	0.014+-0.001	0.002+-0.001	0.070+-0.003		0.689+-0.005	0.261+-0.004
DXS7423	0.123	0.026*	0.186*	0.029			-0.003
	0.028+-0.002	0.000+-0.000	0.000+-0.000	0.009+-0.001			0.667+-0.004

*Valores de p significativos después de la corrección de Bonferroni (<0.005)

Fuente: elaborado por el autor.
Diferencia genética calculada mediante Rst para cada uno de los 10 STRs (excepto para DXS9898 y DXS6809 los cuales se calcularon con F_{ST}) y los valores de p del test exacto de diferenciación arrojados al compararse las frecuencias alelicas de la población santandereana con las reportadas en diferentes poblaciones

5.8 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN

El mismo set de 10 STRs del cromosoma X fue tipificado en un total de 51 tríos (padre-madre-hija) y 43 dúos (madre-hijo) y un dúo (padre-hija). En los que se realizó el análisis de filiación y se detectaron 4 mutaciones, en un total de 1460 transferencias alélicas (Tabla 11); dos de las cuales fueron de origen paterno hallados en los sistemas DXS6809 (caso2) y DXS8377 (caso3), una mutación de origen materno se identificó en el sistema DXS8377 (caso 4) y una cuarta mutación se presentó en el sistema DXS7132 la cual no fue posible definir el origen (caso1). En tres de los casos la mutación se debió a la ganancia o pérdida de una repetición, pero en el sistema DXS8377 se encontró una mutación de 2 pasos entre el alelo 53 tipificado en el padre y el alelo 55 encontrado en la hija, generada por la ganancia de 6 nucleótidos.

La tasa de mutación calculada para todos los 10 loci analizados fue de 2.74 $X10^{-3}$ (95% CI 0.75-7.00$X10^{-3}$) por locus/meiosis. Esta tasa de mutación observada para cada uno de los loci fue ajustada teniendo en cuenta las mutaciones reportadas en otros estudios[168], un total de 21 mutaciones fueron compiladas en 10356 transmisiones alelicas, evidenciando una tasa de mutación de 2.0278 $X10^{-3}$ (95%CI 1.0446 -3.0724$X10^{-3}$) por locus/meiosis, estos resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 11. Mutaciones observadas en un total de 51 tríos padre/madre/hija, 43 dúos madre/hijo y un dúo padre/hija para los STRs del cromosoma X.

LOCUS	CASO	GENOTIPO		EDAD*	INDICE PATERNIDAD	INDICE MATERNIDAD
DXS7132	1	Padre	13	32	367517595,81923	197951739,8
		Madre	13-15	23		
		Hija	13-14	---		
DXS6809	2	Padre	34	48	26098374,348	15129121,5
		Madre	33-34	39		
		Hija	33-35	----		
DXS8377	3	Padre	53	30	1413367738,8	1041388847,8
		Madre	45-46	30		
		Hija	46-55	---		
	4	Padre	51	25	1519060,8793	4216916,7
		Madre	46-58	14		
		Hijo	59	---		

*Edad del padre y la madre al momento del nacimiento (años)

Fuente: elaborado por el autor

La tabla presenta los 4 casos conformados por un trio (padre/madre/hijo(a)) donde se halló una posible mutación en uno de los STRs. A estos casos se calculó el indice de paternidad y de maternidad con el fín de demostrar la filiación.

[168]EDELMANN J et al, 2001; HERING S et al,2001; EDELMANN J et al 2002; ZARRABEITIA M et al 2002; SZIBOR R et al 2003; PELOSO G et al 2004; SHIN KJ et al 2004; TURRINA S et al 2004; POETSCH M et al 2005; SHIN SH et al 2005; TABBADA KA et al 2005; TANG WM et al 2006; PEPINSKI W et al 2007; TURRINA S et al 2007

Tabla 12. Tasa de mutación por locus para 10 sistemas STRs del cromosoma X

STR	MUTACION/MEIOSIS	μ ($X10^{-3}$)
DXS8378	1/850	1,1764
DXS7132	3/1117	2,6857
DXS9898	0/1030	0,0000
DXS6809	1/236	4,2372
DXS6789	0/1472	0,0000
DXS101	0/1391	0,0000
GATA172D05	1/876	1,1415
HPRTB	4/1367	2,9261
DXS8377	9/1186	7,5885
DXS7423	2/831	2,4067

μ: tasa de mutación

Fuente: elaborado por el autor.

La tabla presenta las mutaciones encontradas por diferentes autores y el total de meiosis estudiadas, lo cual permite calcular la tasa de mutación ajustada para cada uno de los sistemas STRs del X evaluados en este estudio.

A pesar que el número de meiosis recopiladas no son suficientes se puede apreciar una diferencia marcada entre los sistemas, donde se observa que el DXS8377 presenta la mayor tasa de mutación (7,58 $x10^{-3}$) seguido de los sistemas HPRTB y DXS7132 los cuales evidenciaron tasas de 2,9261$x10^{-3}$ y 2,6857 $x10^{-3}$ respectivamente.

Por otra parte no se detectaron mutaciones en los sistemas DXS8378, DXS9898, HPRTB, GATA172D05, DXS101, DXS6789 y DXS7423.

Para el sistema DXS6809 pocos análisis de mutación han sido realizados, la única mutación encontrada en 236 meiosis, es la reportada en este estudio.

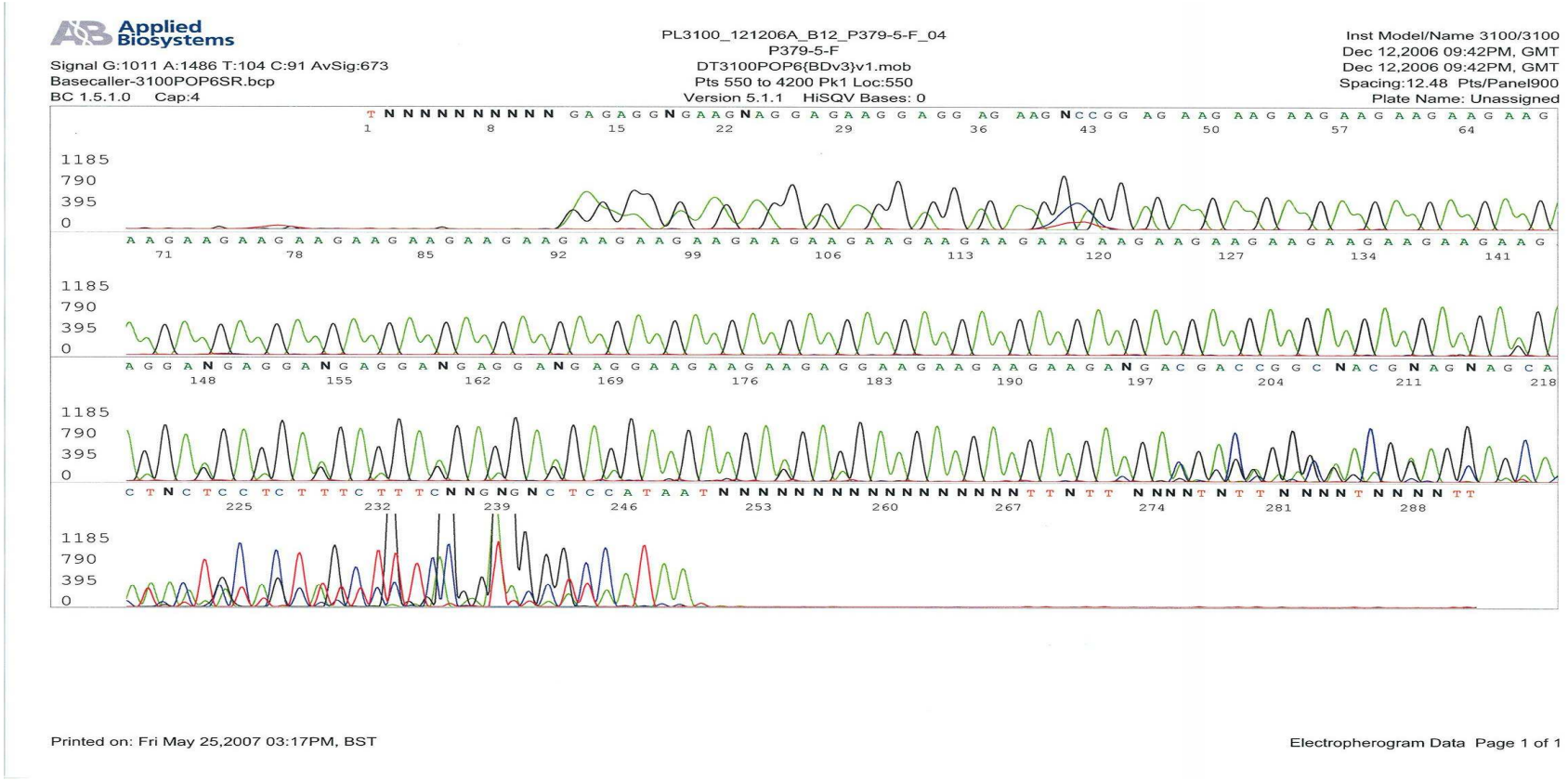
5.9 SECUENCIACIÓN

Debido a la estructura compleja del sistema DXS8377 ((AGA)n (GGA-AGA)n (AGA)n-GGA-(AGA)n) el cual presenta repeticiones tri y hexanucleotídicas, la mutación podría haber ocurrido como una ganancia de dos repeticiones del motivo de secuencia (trinucleótidica) o como una duplicación de la secuencia intermedia (hexanucleótidica). Para dilucidar esto se realizo la secuenciación del sistema en el padre y la hija, cuyos resultados se muestran en las Figuras 2-5.

Los resultados de la secuenciación mostraron que la mutación se originó por la ganancia de dos repeticiones ocurrida en el motivo trinucleotídico del padre [$(AGA)_{33}$-(GGA-AGA)$_5$-$(AGA)_2$-GGA-$(AGA)_6$] a la hija [$(AGA)_{35}$-(GGA-AGA)$_5$-$(AGA)_2$-GGA-$(AGA)_6$]. Sin embargo la estructura alélica observada corresponde a una repetición menor que el determinado por el tamaño del fragmento amplificado. Estos resultados son explicados por la inserción de 3 pb (AGG) en la región flanqueante 5' presente tanto en el padre como en la hija, dando origen a la siguiente secuencia:

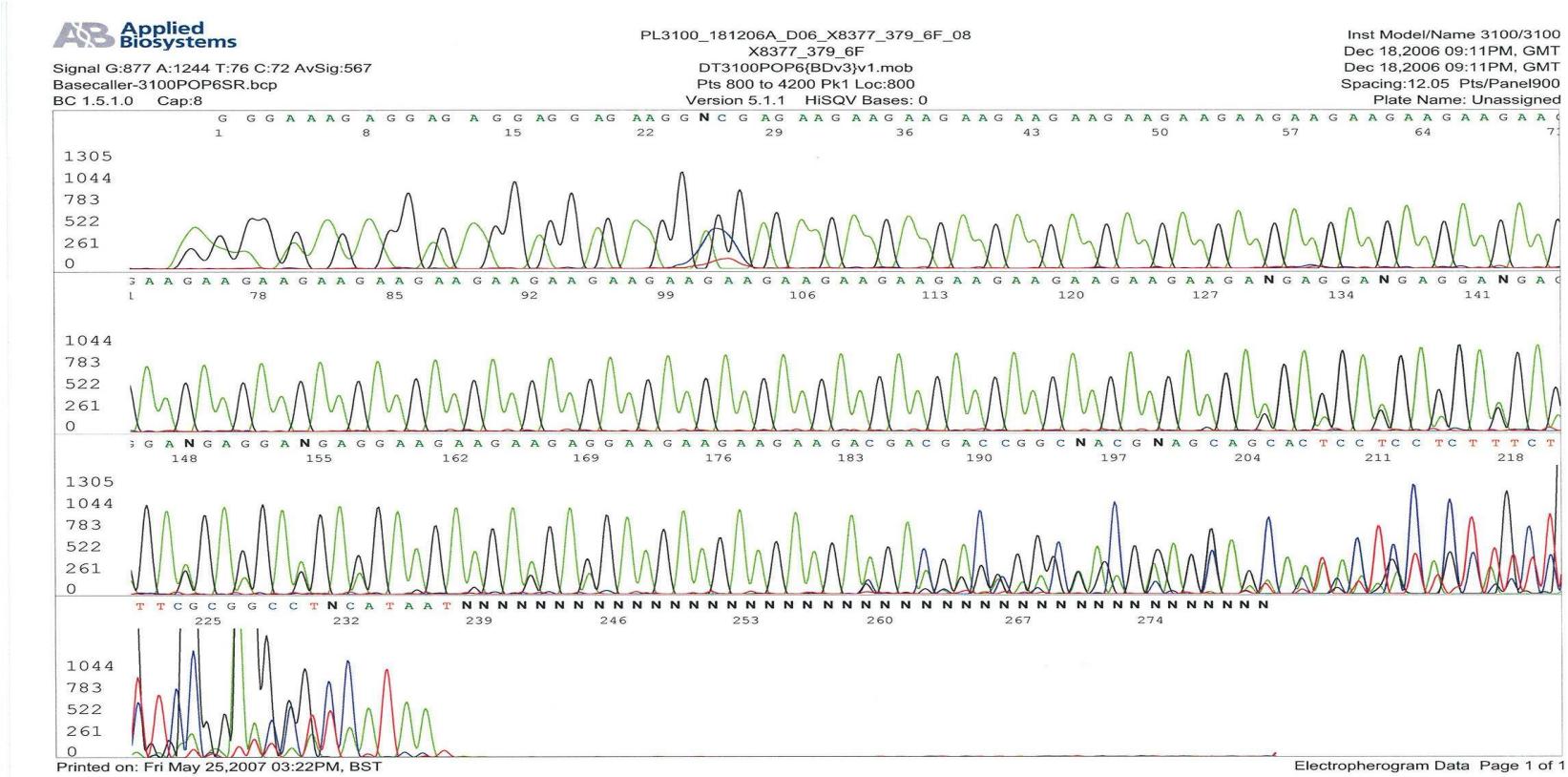
Primer Forward -AGAGAGGAGAAGAAGGAGAAGGAGGAGA$(AGG)_2$ -Motivo de repetición.

Figura 2. Secuenciación del sistema DXS 8377 presente en el padre del caso 3 (primer forward)



En esta figura se puede apreciar la secuencia en tarden del motivo de repetición del sistema DXS8377 (primer forware) correspondiente al alelo 53 presente en el padre del caso 3 en el cual se observa una secuencia [$(AGA)_{33}$-(GGA-AGA)$_5$-$(AGA)_2$-GGA-$(AGA)_6$]

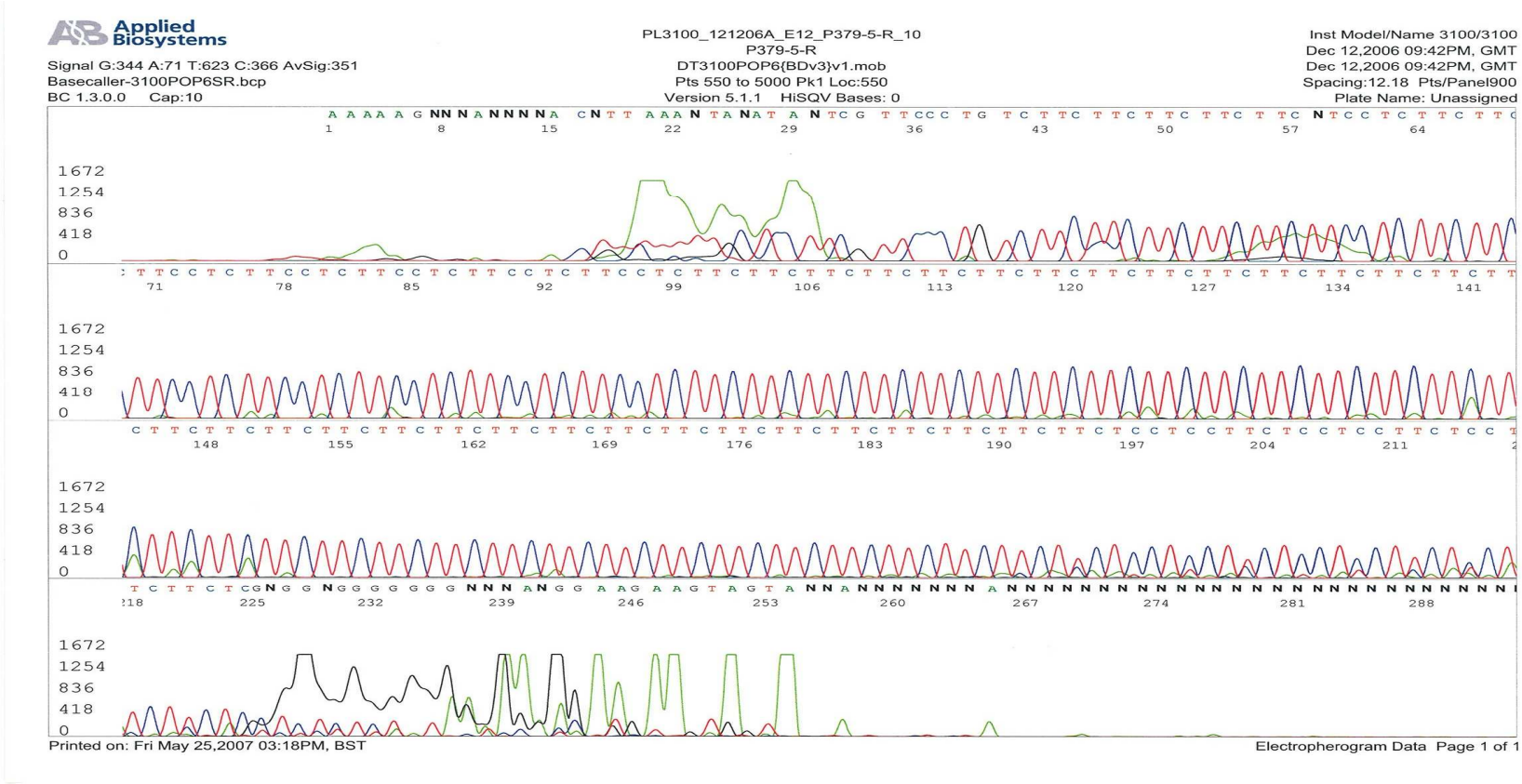
Figura 3. Secuenciación del sistema DXS 8377 presente en la hija del caso 3 (primer forward)



Fuente: elaborado por el autor.

En esta figura se puede apreciar la secuencia en tarden del motivo de repetición del sistema DXS8377 (primer forware) correspondiente al alelo 55 presente en la hija del caso 3 en el cual se observa una secuencia $[(AGA)_{35}$-$(GGA\text{-}AGA)_5$-$(AGA)_2$-GGA-$(AGA)_6]$, demostrando la ganancia de 2 repeticiones del motivo trinucleotidico (AGA) del padre a la hija.

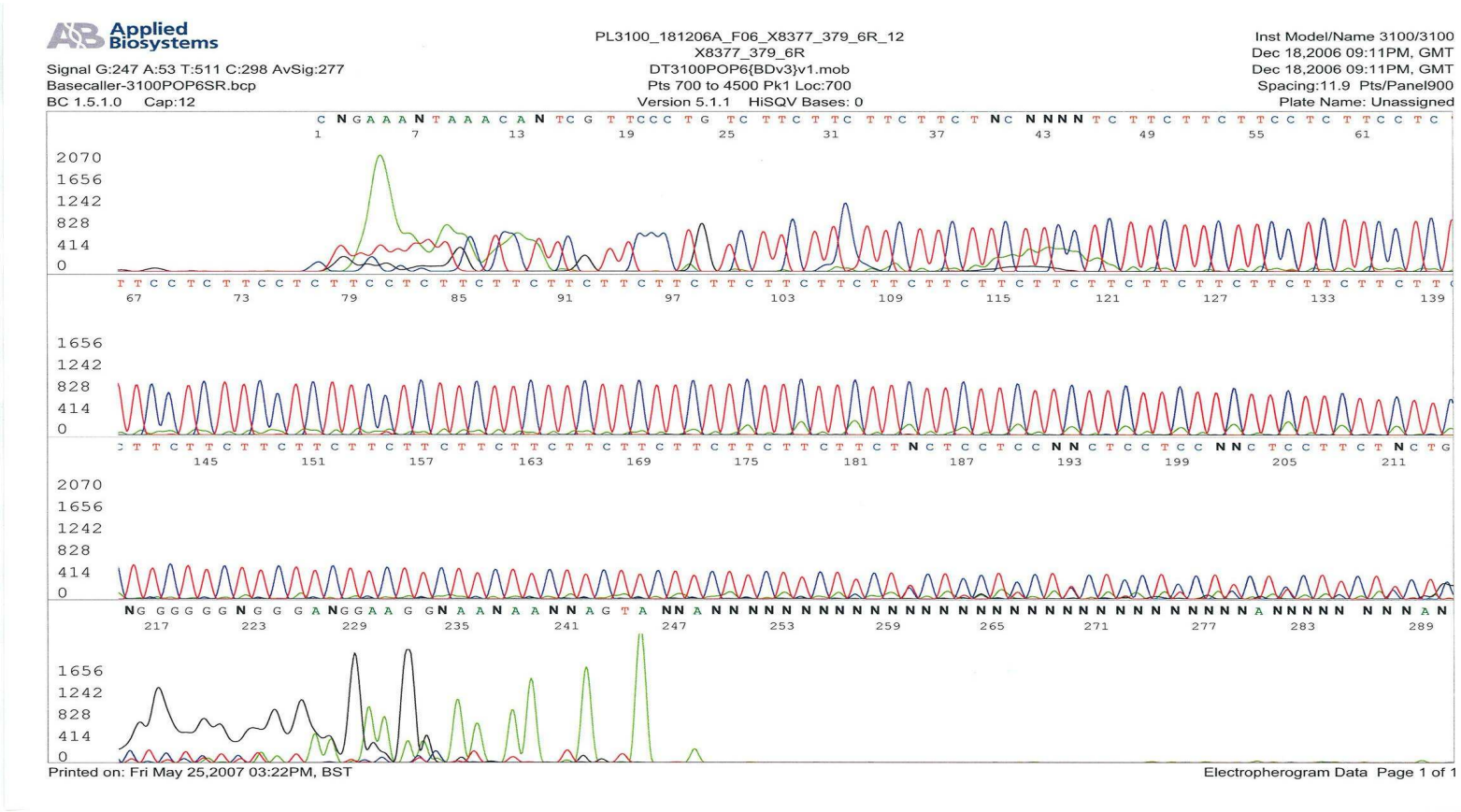
Figura 4 Secuenciación del sistema DXS 8377 presente en el padre del caso 3 (primer reverse)



Fuente: elaborado por el autor.

En esta figura se puede apreciar la secuencia en tarden del motivo de repetición del sistema DXS8377 (primer reverse) correspondiente al alelo 53 presente en el padre del caso 3 en el cual se observa una secuencia complementaria con la presentada en la figura 2

Figura 5. Secuenciación del sistema DXS 8377 presente en la hija del caso 3 (primer reverse)



Fuente: elaborado por el autor.

En esta figura se puede apreciar la secuencia en tarden del motivo de repetición del sistema DXS8377 (primer reverse) correspondiente al alelo 55 presente en la hija del caso 3 en el cual se observa una secuencia complementaria a la presentada en la figura 3.

6. DISCUSION

6.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN SANTANDEREANA

En este estudio se observo que la distribución de los alelos de los 10 loci STRs del cromosoma X fue igualmente polimórfico en la población santandereana como en la antioqueña y en otras poblaciones analizadas y reportadas previamente.[169, 170, 171, 172, 173, 174] La población estudiada no presentó desviación del equilibrio de HW lo cual permitió establecer que ésta, se mezcla aleatoriamente y no ha sido afectada por mutación, selección o deriva genética.

A pesar de que los 10 loci estudiados se encuentran ubicados en el mismo cromosoma, no se encontró estadísticamente asociación entre ellos, sin embargo es de resaltar que los test de desequilibrio de ligamiento realizados entre los loci DXS8378 y DXS101, DXS7132 y DXS6809, y DXS9898 y DXS101 presentaron valores de p inferiores a 0.05 antes de aplicar la corrección de Bonferroni; Debido a que estos pares de marcadores son completamente distantes en el cromosoma y no se encontró una asociación significativa entre los marcadores localizados en las regiones intermedias; no se espera que exista un desequilibrio de ligamiento real entre ellos, y por tanto los resultados obtenidos pueden ser atribuidos a efecto del muestreo.

Estudios realizados en otras poblaciones reportan igualmente ausencia de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores que estudiaron,[175, 176] esto es debido posiblemente a que el cromosoma X es muy propenso a la recombinación, alcanzando valores similares a los presentados en marcadores autosómicos, sin embargo Edelmann reportó desequilibrio de ligamiento entre los sistemas DXS101 y DXS7424 y Szibor lo reportó entre los sistemas DXS6809 con DXS6801 y DXS6789, esto es debido a la distancia tan estrecha que hay fisicamente entre ellos.[177, 178]

[169] GU S, Op. cit. p. 74.
[170] TURRINA S, ATZEI R, FILIPPINI G, DE LEO D. Op. cit. p. 74.
[171] ZARRABEITIA MT,Op. cit. p. 305.
[172] PEREIRA R, GOMES I, AMORIM A, GUSMÃO L. Genetic diversity of 10 X-chromosome STRs in northern Portugal. Int J Legal Med 2006; DOI 10.1007/s00414-006-0144-4 p. 10.1007.
[173] SHIN SH, et al. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. Forensic Sci Int 2005; 147: p. 40.
[174] MORENO MA, et al. Op. cit. p. 296.
[175] GOMES I, et al. Op. cit. p. 2007.01.001.
[176] ZARRABEITIA MT, et al. Op. cit. p. 305.
[177] EDELMANN J, HERING S, KUHLISCH E, SZIBOR R. Op. cit. p. 220.
[178] SZIBOR R, et al. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq 21 provides a powerful tool for kinship testing. Int. J Legal Med 2005; 119: p. 368.

A pesar de la diferencia en el componente genético para estos 10 marcadores en hombres y en mujeres, y teniendo en cuenta que 1/3 de los cromosomas X pertenecen a los hombres y 2/3 a las mujeres; la distribución de las frecuencias alélicas entre los sexos no presentó diferencias significativas. Estos resultados son de esperar si tenemos en cuenta que cuando se trata de marcadores ligados al sexo, a través de las generaciones las diferencias de las frecuencias entre hombres y mujeres tienden a cero. Hallazgos similares se presentaron en otros estudios publicados en poblaciones Italianas, españolas y Chinas.[179].[180].[181].[182]

Al observar el comportamiento de las frecuencias alélicas totales para la población santandereana, se observa que presenta una distribución similar a la reportada para la población hispánica en los sistemas DXS101, DXS9898, DXS6789 y DXS6809, sin embargo en los demás sistemas se presentan discrepancias considerables. [183]

En el sistema DXS7423 el alelo 15 es el más frecuente en la población estudiada a diferencia de las poblaciones hispanas, afroamericana y asiática reportadas por Gomes, donde la frecuencia más alta se presentan para el alelo con una repetición menos.[184] Sin embargo frecuencias concordantes con los datos hallados en este estudio fueron reportadas en la población española. [185],[186],[187]

Las frecuencias para el sistema DXS7132 no presentan grandes diferencias entre las poblaciones Europea, Africana e Hispana, las frecuencias calculadas para la población santandereana son similares a las reportadas en los estudios de Gomes et al para poblaciones africanas y tres grupos poblacionales de Estados Unidos,[188],[189] y a la muestra de España publicada por ALER.[190] Pero estas poblaciones no reportan los alelos 18 y 19 encontrados en Santander los cuales han sido descritos solo en población china y coreana.[191],[192] Esto podría sugerir el aporte de la población asiática en el componente genético de Santander.

[179]BINI C, Op. cit. p. 234.
[180]TANG WM, Op. cit. p. 65.
[181]GOMES I, CARIACEDO A, AMORIN A, GUSMAO L. Op. cit. p. 315.
[182]ZARRABEITIA MT, ALONSO A, MARTIN J, Op. cit. p. 306.
[183]GOMES I, et al. Op. cit. p. s00414-006-0146-2.
[184]Ibid. p. 10.1007.
[185]ALER M, SÁNCHEZ-DIZ P, GOMES I, Op. cit. p. 10.023.
[186]ZARRABEITIA MT, et al. Sequence structure and population data of two X-linked markers: DXS7423 and DXS8377. Int J Legal Med 2002; 116: p. 370.
[187]ZARRABEITIA MT, et al. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. Forensic Sci Int 2002; 129:p. 88.
[188]GOMES I, et al. Op. Cit. p. 01.001.
[189]Gomes I, et al. Op. Cit. p. 10.1007.
[190]ALER M, et al. Op. cit. p. 10.023.
[191]CHEN MY, PU CE. Op. Cit. p. 67.
[192]SHIN SH, YU JS, PARK SW, MIN GS, CHUNG KW. Op. cit. p. 40.

Algo similar ocurre con el sistema HPRTB donde las frecuencias de la población santandereana no presentaron diferencias marcadas con la distribución alelica presentada en población europea, asiatica, hispana y africana.[193],[194],[195]

En el sistema DXS8378 las frecuencias alelicas se distribuyen de manera más parecida a la población asiática, española y china[196],[197],[198] que a la población afroamericana e hispana reportados por Gomes. [199] En estas poblaciones no se encontró el alelo 14 presente en la muestra de Santander, aunque con una baja frecuencia; el cual ha sido reportado en la población Germana en estudios realizados por Edelmann[200] y Poetsch. [201]

En el sistema DXS8377 la distribución de las frecuencias es muy homogénea entre el gran número de alelos que corresponden a este marcador, el alelo 39 y 58 presente en Santander se ha observado solo en población Hispana, en africanos y finlandeses con frecuencias similares. [202],[203],[204]

En el sistema GATA172D05 frecuencias alélicas similares a las presentadas en Santander se encontraron en población coreana. [205] Se hallaron los alelos 13 y 14 con un peso de 135.4 pb y 139.56 pb respectivamente los cuales no han sido reportados en otras poblaciones; aunque es necesario ampliar los análisis de estos sistemas en Colombia, dichos alelos podrían servir como marcadores de esta población.

Las diferencias encontradas en cada uno de los loci con una o varias poblaciones, está demostrando que no es conveniente utilizar las frecuencias publicadas en otras poblaciones por más cercanas que parezcan y resaltan la importancia de calcular la distribución de las frecuencias alélicas para una población en particular donde se desea implementar el análisis de marcadores STRs del cromosoma X con el fin de aplicarlos correctamente.

[193]GOMES I, et al. Op. cit. p..01.001.
[194]GOMES I, et al. .Op. cit. p. 10.1007.
[195]TANG WM, TO KY. Op. cit. p. 65.
[196]ALER M, SANCHEZ-DIZ P, GOMES I, et al. Op. cit. p..10.023.
[197]GOMES I, et al. Op. cit. p. 10.1007.
[198]TANG WM, TO KY. Op. cit. p. 65.
[199]GOMES I, et al. Op. cit. p. 10.1007.
[200]EDELMANN J, et al. Op. cit. p. 218.
[201]POETSCH M, PETERSMANN H, REPENNING A, LIGNITZ E. Op. Cit. p. 155: p. 76.
[202]GOMES I, et al. Op. cit. p. 01.001.
[203]Gomes I, Prinz M, Pereira R, Meyers C, Mikulasovich RS, Amorim A .Op. Cit. p. 10.1007.
[204]VAUHKONEN H, VAUHKONEN M, SIPPONEN P, SAJANTILA A. Correlation between the allelic distribution of STRs in a Finnish population and phenotypically different gastrointestinal tumours: a study using four X-chromosomal markers (DXS7423, DXS8377, ARA, DXS101). Ann Hum Genet 204; 68: p. 560.
[205]SHIN KJ,. et al. Op. cit. p. 39.

6.2 EFICIENCIA FORENSE DE LOS MARCADORES

En nuestra población el sistema DXS8378 fue el menos polimórfico, seguido de el DXS7423 lo cual, también ha sido reportado en población de Uganda y Ewenke.[206],[207] El sistema que presenta mayor diversidad es el marcador DXS8377, al igual que se ha reportado en antioqueños, españoles, africanos y poblaciones afroamericanas, asiáticas e hispanas que viven en Estados Unidos,[208],[209],[210],[211] esto se debe al gran número de alelos presente en este marcador y a la distribución homogénea de las frecuencias entre ellos. El DXS101 también es un marcador que presento un alto polimorfismo como se demostró en un grupo étnico Ewenke[212] y en la población mongola. [213]

Para todos los valores obtenidos el poder de discriminación fue mayor en mujeres (1 en $9x10^{10}$) que en hombres (1 en $3x10^{6}$) tal como lo reporta la literatura,[214],[215],[216],[217] lo cual es claramente explicado ya que 1/3 de los cromosomas X pertenecen a los hombres y 2/3 a las mujeres y por tanto en las mujeres el numero de genotipos y la probabilidad de diferenciar un individuo con otro tomado al azar en la población es mayor. Este alto polimorfismo reportado en todos los sistemas (≥0.63), confirma el gran potencial de estos marcadores en pruebas de identificación forense.

De acuerdo al poder de Exclusión a priori calculado para los 10 sistemas en dúos de 99.993% y en casos que involucran tríos de 99.9999% confirma el potencial de este decaplex en análisis de filiación donde el descendiente sea de sexo femenino o donde se investiga relación de parentesco padre/hija.

El set de los 10 sistemas analizados en este estudio presenta una eficiencia forense un poco mas baja que la reportada en muestras de España,[218],[219] excepto para los sistemas DXS7132 y HPRTB y que la población africana[220] excepto para los sistemas DXS7132, HPRTB y GATA172D05, lo cual sugiere que la población santandereana es más homogénea que estas dos poblaciones.

---

[206]GOMES I, et al. Op. cit. p..01.001.
[207]GU S, LI S, Op. cit. p. 74.
[208]ALER M, SANCHEZ-DIZ P, GOMES I, et al. Op. cit. p..01.001.
[209]MORENO MA, et al. Op. cit. p. 296.
[210]GOMES I, et al. Op. cit. p .01.001.
[211]GOMES I, et al. Op. cit. p. 10.007.
[212]GU S, Op. cit. p. 74.
[213]QINGBO L, LI S. Op. cit. p. 158: p. 78.
[214]EDELMANN J., et al. Op. Cit. p. 217.
[215]TURRINA S, DE LEO D. Op. Cit. p. 303.
[216]MATSUSHITA H, et al. Allele frequencies of dinucleotide repeat marker loci on the X chromosome in the Japanesse population. FSI 2002; 129: p. 136.
[217]MATSUSHITA H, et al. Genetic analysis of 18 STR loci on the X chromosome in a Japanese population. International Congress Series 2003; 1239: p. 332.
[218]ALER M, SANCHEZ-DIZ P, GOMES I, et al. Op. cit. p. 10.023.
[219]ZARRABEITIA M, et al. Op. cit. p. 88.
[220]GOMES I, ALVES C, et al. Op. cit. p. 01.001.

Resultados similares se observaron al comparar con hispanos donde todos los marcadores, excepto el DXS7423 reportaron mayor eficiencia; y en afroamericanos donde solo los sistemas GATA172D05, DXS7132 y DXS7423 presentan menor eficiencia que en nuestra población. Contrario a esto, se observó que los 10 STRs de este estudio, presentan una mejor eficiencia forense en nuestra población que en los individuos Asiáticos analizados por Gomes. [221]
En fin, el hecho de que la eficiencia forense de estos sistemas presente diferencias entre las poblaciones, revela la necesidad de realizar estudios previos de la población donde se van a aplicar, con el fin de seleccionar cuales de los marcadores son los más informativos y los que discriminan mejor en nuestro entorno.

6.3 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

En la población colombiana se conoce muy poco sobre la distribución de las frecuencias de los sistemas STRs del cromosoma X por tal razón, en este trabajo se compararon las frecuencias calculadas en la muestra de individuos de Santander, con la informada en una población de Antioquia, ya que es el único trabajo publicado para marcadores del cromosoma X en la población colombiana. Adicionalmente se compararon las frecuencias de Santander con población caucásica, afro americana e hispana y dos poblaciones suramericanas, con el fin de evaluar si exiten diferencias genéticas significativas con respecto a estos 10 marcadores STRs del cromosoma X.

Aunque no se obtuvo mayor información en poblaciones latinoamericanas, en los sistemas que se compararon: DXS6809, DXS6789, DXS8377 y GATA172D05 con el Perú y HPRTB con Argentina[222,223,224] no presentaron diferencias genéticas significativas, al igual que en los dos sistemas (DXS8377 y DXS7423) que se compararon con la población Antioqueña.

Es de resaltar que al compararnos con las poblaciones españolas, alemanas y afroamericanas se apreciaron moderadas diferencias significativas en la mayoría de los marcadores, de igual manera existe una gran diferencia entre la distribución de las frecuencias alelicas del sistema GATA172D05 de la población santandereana y la presentada en alemanes y afroamericanos; y de los marcadores DXS7132, HPRTB y DXS7423 con estas dos respectivas poblaciones.

Estos análisis nos indican que utilizar una base de datos global para este decaplex no es indicado, teniendo en cuenta que el estudio de estos marcadores es reciente y solo podemos disponer de datos de poblaciones de continentes con

[221] I GOMES I, PRINZ M, et al. Op. cit. p. 10.1007.
[222] EDELMANN J, HERING S, BRUNDIRS N, LESSIG R, KUHLISCH E, SZIBOR R. Op. Cit. p. 264.
[223] MORENO MA, et al. Op. cit. p. 296.
[224] GANGITANO DA, Op. cit. p. 418.

los que presentamos diferencias genéticas significativas. Por tal razón cobran importancia los estudios que permitan aumentar las bases de datos poblacionales y fortalecer el uso de estos marcadores en cada población.

6.4 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN

La población santandereana analizada presentó un mayor número de mutaciones que las reportadas en otras poblaciones, mientras que en este estudio se hallaron 4 mutaciones en los sistemas DXS8377, DXS7132 y DXS6809, análisis de segregación realizados con 150 meiosis en población Polaca, 106 meiosis en población china, 50 meiosis en población alemana y 300 meiosis en población italiana[225, 226, 227, 228, 229] no reportaron ninguna mutación para los sistemas estudiados. Por el contrario Szibor encontró mutaciones en varios de estos sistemas presentando una tasa de mutación general para los marcadores STRs del cromosoma X de $2.09x10^{-3}$, similar a la encontrada en este estudio. [230]

El sistema DXS8377 presenta una tasa de mutación marcadamente superior a los demás sistemas analizados, esto es debido a la complejidad de su estructura; sin embargo las mutaciones reportadas para este y los demás sistemas han sido de un solo paso mutacional[231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239] mientras que uno de los casos presentados en este estudio evidenció una mutación en este marcador originada por la inserción de 2 motivos de repetición.

En algunos sistemas se han reportados mutaciones o alelos intermedios que se originan no por alteración del motivo de repetición sino por inserciones o deleciones de secuencias en las regiones flanqueantes, como se pudo evidenciar en el caso 3 de este estudio y en estudios realizados por Tabbada, [240] lo cual genera la posibilidad de realizar una asignación alélica errada, por una modificación en el tamaño del fragmento amplificado. En los sistemas en los que se presentan estas modificaciones, se hace necesario evaluar los primers utilizados con el fin de evitar la amplificación de dichas regiones no involucradas en el STR que son susceptibles de mutación.

---

[225]TURRINA S, DE LEO D. Op. cit. p. 303.
[226]PEPINSKI W, et al. Op. cit. p. 01.007.
[227]POETSCH M, PETERSMANN H, REPENNING A, LIGNITZ E. Op. cit. p. 155: p. 75.
[228]TANG WM, TO KY. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. FSI 2006; 162: p. 64.
[229]WIEGAND P, BERGER B, EDELMANN J, PARSON W. Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. Int J Legal Med 2003;117: p. 64.
[230]BINI, Op. cit. p. 234.
[231]SZIBOR R, et al. Op. cit. p. 69.
[232]SHIN KJ, et al. Op. cit. p. 39.
[233]TURRINA S, ATZEI R, FILIPPINI G, DE LEO D. Op. cit. in press.
[234]PEPINSKI W, et al. Op. cit. p. 01.007.
[235]POETSCH M, PETERSMANN H, REPENNING A, LIGNITZ E. Op. cit. p. 155: p. 75.
[236]TANG WM, TO KY. Op. cit. p. 162: p. 65.
[237]TABBADA KA, DE UNGRIA MC, FAUSTINO LP, ATHANASIADOU D, Op. cit. p. 176.
[238]ZARRABEITIA M, et al. Op. cit. p. 129: p. 87.
[239]PELOSO G, GRIGNANI P, PREVIDRE C. Allele distribution of five X-chromosome STR loci in an Italian population simple. International Congress Series 2004; 1261: p. 261.
[240]TABBADA KA, DE UNGRIA MC, FAUSTINO LP, ATHANASIADOU D, Op. Cit. p. 177.

La tasa de mutación ajustada para los marcadores STRs del cromosoma X (1.7743 $X10^{-3}$ por locus/meiosis) es baja y se encuentran dentro del intervalo de confianza de 95% de otras tasas de mutación estimadas y publicadas para STRs autonómicos y del cromosoma Y. [241], [242], [243], [244] Esta característica junto con la alta variabilidad, poder de discriminación y poder de exclusión a priori anteriormente demostrado, confirman que estos sistemas son excelentes herramientas para ser utilizadas en identificación humana y pruebas de filiación.

[241] BRINKMANN B, et al. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. Am J Hum Genet 1998; 62: p. 1411

[242] KAYSER M, ROEWER L, HEDMAN M. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. Am J Hum Genet 2000; 66: p. 1582.

[243] DUPUY BM, STENERSEN M, EGELAND T, OLAISEN B. Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci. Hum Mutat 2004; 23: p. 120.

[244] GUSMÃO L, ALVES C. Y chromosome STR typing. Methods Mol Biol 2005; 297: p. 77.

7. CONCLUSIONES

- No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas en hombres y en mujeres para los 10 marcadores del cromosoma X analizados

- El sistema DXS8377 presenta la distribución más homogénea de las frecuencias genotípicas, a diferencia del DXS6789 el cual concentra en 3 de los 11 genotipos presentes al 70% de la población.

- Los marcadores STRs del X presentan una distribución homogénea de las frecuencias alélicas en la población santandereana exceptuando al sistema DXS8378 cuyo alelo más frecuente se encuentra en el 50% de los individuos.

- El DXS8377 es el sistema que permite una mayor discriminación entre individuos de la población santandereana y posee un mayor poder de exclusión a priori, por lo cual se constituye en el mejor marcador para ser utilizado en análisis forenses.

- Conjuntamente los 10 sistemas proporcionan un alto poder de discriminación y poder de exclusión a priori, lo cual hace de este decaplex una gran herramienta para ser utilizada tanto en el campo de la identificación humana como en pruebas de filiación que involucren tríos o dúos de la población santandereana.

- La población santandereana presentan una alta diferenciación genética con las poblaciones alemana y afro americana, y en un menor grado con la población española; al igual que presentan distancia genéticas significativas en 2 de los 10 marcadores comparados con la población hispana, destacando así la necesidad de crear bases de datos propias con el fin de utilizar correctamente estos marcadores en los análisis de nuestra población.

- La tasa de mutación que presentan los STRs del cromosoma X es de 2.74 x $10^{-3,}$ similar a la de los marcadores STRs autosomicos, y del cromosoma Y, lo cual reafirma que son sistemas genéticos muy estables.

- característica como un alto poder de discriminación, alto poder de exclusión a priori, baja tasa de mutación, condición de equilibrio de Hardy-Weinberg para los sistemas en la población y ausencia de desequilibrio de ligamiento permiten confirmar que los sistemas STRs del cromosoma X; son una excelente herramienta en el análisis de filiación y en pruebas de identificación humana que se realicen con población santandereana.

8. RECOMENDACIONES

✓ Realizar estudios en otras poblaciones colombianas, con el fin de establecer una caracterización genética del país para estos marcadores y poder determinar el componente ancestral de nuestras poblaciones.

✓ Evaluar la utilidad de haplogrupos de estos marcadores en casos complejos de filiación con el fin de aprovechar al máximo la utilización de estos marcadores.

✓ Realizar más estudios de segregación con el fin de ajustar las tasas de mutación por sistemas y por sexos, para cada uno de los STRs del cromosoma X.

✓ Realizar la secuenciación de las demás mutaciones encontradas en este estudio para determinar la estructura del alelo mutado y establecer a partir de cual de los progenitores se originó.

BIBLIOGRAFÍA

ALER, M., et al. Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample. Forensic Sci Int 2007; doi:10.1016/j.forsciint.2006.10.023.

ATHANASIADOU D, et al. Development of a quadroplex PCR system for the genetic analysis of X-chromosomal STR loci. International Congress Series 2003; 1239: 311-314.

AUGUSTIN C., et al. Forensic evaluation of three closely linked STR markers in a 13 kb region al Xp11.23. Internacional Congreso Series 2006; 1288: 277-279

BINI, C., et al. Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study. Forensic Sci Int 2005; 153: 231-236.

BRIKMANN, B. The STR approach. Adv Forensic Haemogenetics 1996; 6:41-51.

_____, KLINTSCHAR, M., NEUHUBER, F., HUHNE, J., ROLF, B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. Am J Hum Genet 1998; 62:1408-1415

BURGER, M., et al. Elevated microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats does not correlate with clinicopathologic features of bladder cancer. European Urology 2006; 50: 770-776.

CARRACEDO, A., et al. Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding the reproducibility and robustness of the Y-chromosome STRs DYS19, DYS389I and II, DYS 390 and DYS 393 in a PCR pentaplex format. FSI 2001; 119: 28-41.

CARVAJAL-CARMONA, LG., SOTO, ID., PINEDA, N. Strong Amerind/white sex bias and a possible sephardic contribution among the founders of a population in Northwest Colombia. Am J Hum Genet 2000; 67:1287–1295.

CERRI, N., et al. Population data for tour X-chromosomal STR loci in a population simple from Brescia (northern Italy). International Congress Series 2006; 1288: 286-288.

CHEN MY, PU CE. Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377, and DXS9895 in Taiwan. Forensic Sci Int 2004; 146: 65-7.

_____, et al. Population data on X chromosome short tandem repeat loci HPRTB and AR in Taiwan. Forensic Sci Int 2002; 126: 171-172.

DESMARAIS, D., et al. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). J Forensic Sci 1998; 43:1046-1049.

DUPUY, BM., STENERSEN, M., EGELAND, T., OLAISEN, B. Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci. Hum Mutat 2004; 23:117-124.

EDELMANN, J, et al. Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. Forensic Sci Int 2002; 129: 99-103.

_____, et al. Allele frequencies for X-chromosomal microsatellites in different populations. International Congress Series 2004; 1261: 263-265.

_____, HERING, S., KUHLISCH, E., SZIBOR, R. Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. Forensic Sci Int 2002; 125: 217-222.

_____, et al. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. Forensic Sci Int 2001;124: 215-218.

_____, LESSIG, R., HERING, S., HORN, LC. Loss of heterozygosity and microsatellite instability of forensically used STR markers in human cervical carcinoma. International Congres Series 2004; 1261: 499-501.

_____, Szibor R. DXS101: a highly polymorphic X-linked STR. Int J Legal Med 2001; 114: 301-304.

_____, _____. The X-linked STRs DXS7130 and DXS6803. Forensic Sci Int 2003; 136: 73-75.

_____, _____. Validation of the X-linked STR DXS6801. Forensic Sci Int 2005; 148: 219-220.

EDWARDS, A., CIVITELLO, A., HAMMOND, HA., CASKEY, CT. DNA typing and genetic mappin with trimeric and tetrameric tandem repeat. Am J Hum Genet 1991;49:746-756.

_____, HAMMOND, HA., JIN, L., CASKEY, CT., CHAKRABORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric repeat loci in four human population groups. Genomics 1992; 12:241-253.

EMERY, AEH**.** Methodology in medical genetics. An Introduction to statistical Methods. Churchill Livingstone, London, Great Britain 1976; 3-10.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0. An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 2005; 1:47-50

GANGITANO, DA., et al. Distribution of HumHPRTB and HumF13A01 alleles in Buenos Aires Population (Argentina). J Forensic Sci 2001; 46:418.

GARCÍA, O. Parámetros en identificación forense y criminalística biológica. En: La prueba del AND en medicina forense. Barcelona: Masson, S.A.; 1999. 286-297.

GOLDSTEIN BD, SCHLOTTERER C. Microsatellites evolution and applications. New York: Oxford University Press, 1999. 352p.

GOMES I., et al. Genetic analysis of three US population groups using an X-Chromosomal STR decaplex. Int J Legal Med 2006; DOI 10.1007/s00414-006-0146-2.

_____, et al. Analysis of 10 X- STRs in three African populations. FSI: Genetics 2007; doi:10.1016/j.fsigen.2007.01.001.

_____, CARIACEDO, A., AMORIN, A., GUSMAO, L. A multiplex PCR design for simultaneous genotyping of X chromosome short tandem repeat markers. Int. Congreso Series 2006; 1288: 313-315.

GU, S., LI, S. X-chromosome STRs analysis of Ewenke ethnic population. Forensic Sci Int 2005; (in press)

GUSMÃO, L., ALVES, C. Y chromosome STR typing. Methods Mol Biol 2005; 297:67-82.

HARD, D., CLARK, AC. Principles of populations genetics, 3ª Ed. Sinauer associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts 1997; 71-109.

HERING, S., AUGUSTIN, C., EDELMANN, J., KUHLISCH, E., RODIG, H, SZIBOR, R. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280 kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. Int J Legal Med 2005; DOI10.1007.

_____, _____, _____, Szibor R. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280 kb region of Xq 12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. Int J Legal Med 2005; 116:144-149.

_____, BRUNDIRS, N., KUHLISCH, E., EDELMANN, J., PLATE, I., BENECKE, M. DXS10011: studies on structure, allele distribution in three populations and genetic linkage to further q-telomeric chromosome X markers. Int J Legal Med 2004; 118: 313-319.

_____, KUHLISCH, E., SZIBOR, R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker HumDXS6789 for forensic purposes. FSI 2001; 119:42-46.

http://www.gdb.org .GDB; Genome Database

HUANG, D., YANG, Q., YU, C., YANG, R. Development of the X-linked tetrameric microsatellite markers HumDXS6803 and HumDXS9895 for forensic purpose. Forensic Sci Int 2003; 133: 246-249.

KAYSER, M., ROEWER, L., HEDMAN, M. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. Am J Hum Genet 2000; 66:1580-1588.

KOYAMA, H, et al. Y-STR haplotype data and allele frequency of the DXS10011 locus in a Japanese population sample. Forensic Sci Int 2002; 125: 273-276.

MATSUSHITA H, et al. Allele frequencies of dinucleotide repeat marker loci on the X chromosome in the Japanesse population. FSI 2002; 129:134-136.

_____, et al. Genetic analysis of 18 STR loci on the X chromosome in a Japanese population. International Congress Series 2003; 1239:331-333.

MERTENS G, et al. Mutation of the repeat number of the HPRTB locus and structure of rare intermediate alleles. Int J Legal Med 1999; 112: 192-194.

MILLER, S., DYKES, D., POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl Ac Res 1988; 16: 1215.

MORENO, MA, et al. Validation of five X-chromosomal STRs DXS6800, DXS6807, DXS6798, DXS8377, and DXS7423 in an Antioquian population simple. Internacional Congress Series 2006; 1288:295-297.

MORENO, P., GENE, M. Fundamentos de la variabilidad genética de las poblaciones humanas. En: La prueba del AND en medicina forense. Barcelona: Masson, S.A.; 1999. 257-285.

MORRAL, N., ESTIVILL, X. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. Genomics 1992; 13:1362-1364.

MULLY, JC, et al. Predictive diagnosis of myotonic dystrophy with flanking microsatellite markers. J Med Genet 1991; 28:448-452.

OGINO, S, et al. TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. Human Pathology 2007. doi:10.1016/j.humnpath.2006.10.005.

OGUZTURUN, C., THACKER, CR., SYNDERCOMBE, D. Population study of four X-chromosomal STR loci in the UK and Irish population. International Congress Series 2006; 1288: 283-285.

OUDET, C., HEILIG, R., HANAUER, A., MANDEL, JL. Nonradiactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5´end of the dystrophin gene and estimation of intragenic recombination. Am J Hum Genet 1991; 49:311-319.

PELOSO, G., GRIGNANI, P., PREVIDRE, C. Allele distribution of five X-chromosome STR loci in an Italian population simple. International Congress Series 2004; 1261:260-262.

PEPINSKI, W., et al. X- chromosomal polymorphism data for the ethnic minority of Polish Tatars and the religious minority of Old Believers residing in northeastern Poland. FSI: Genetics. 2007; doi:10.1016/j.fsigen.2007.01.007.

PEREIRA, R., GOMES, I., AMORIM, A., GUSMÃO, L. Genetic diversity of 10 X-chromosome STRs in northern Portugal. Int J Legal Med 2006; DOI 10.1007/s00414-006-0144-4

POETSCH, M., PETERSMANN, H., REPENNING, A., LIGNITZ, E. Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population. Forensic Sci Int 2005; 155:71-76.

_____, et al. Population data of 10 X-chromosomal loci in Latvia. FSI 2006; 157:206-209.

QINGBO, L., LI, S. Patterns of genetic polymorphism at the 10 X-chromosome STR loci in Mongol population. FSI 2006; 158:76-79.

REICH, D., GOLDSTEIN, D, Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. Genetic epidemiology 2000; 20: 4-16.

RICHARDS, RI., SUTHERLAND, GR. Fragil X syndrome: the molecular picture comes into focus. Trends Genet 1992; 8:249-253.

SCHAFFNER, SF. The X chromosome in population genetics. Nature Genetics 2004; 5: 43-51.

SHIN, KJ., et al. Five highly informative X-chromosomal STRs in Koreans. Int J Legal Med 2004; 118: 37-40.

SHIN, SH, et al. Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. Forensic Sci Int 2005; 147: 35-41.

Szibor R, et al. Cell line DNA typing in forensic genetics--the necessity of reliable standards. Forensic Sci Int 2003; 138: 37-43.

_____, _____, ZARRABEITIA, MT., RIANCHO, JA. Sequence structure and population data of the X-linked markers DXS7423 and DXS8377 clarification of conflicting statements published by two working groups. Forensic Sci Int 2003;134: 72-73.

_____, et al. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. Int. J. Legal Med 2005; 119 (6):363-369.

_____, et al. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq 21 provides a powerful tool for kinship testing. Int. J Legal Med 2005; 119:363-369.

_____, et al. Use of X-linked markers for forensic purposes. Int J Legal Med 2003; 117: 67-74.

_____, LAUTSCH, S., PLATE, I., BECK, N. Population data on the X chromosome short tandem repeat locus HumHPRTB in two regions of Germany. J Forensic Sci 2000; 45: 231-233.

_____. X chromosomal markers: Past, present and future. Forensic science international: Genetics 2007; 1: 93-99.

TABBADA, KA, et al. Development of a pentaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies. Forensic Sci Int 2005; 154: 173-180.

TANG, WM., TO, KY. Four X-chromosomal STRs and their allele frequencies in a Chinese population. FSI 2006; 162:64-65.

TURRINA S, et al. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. FSI: Genetics. 2007; in press.

_____, DE LEO, D. Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs (DXS7132, DXS7133 and GATA172D05) in North and South of Italy. International Congress Series 2004; 1261:302–304.

URQUHART, A., KIMPTON, CP., DOWNES, TJ., GILL, P. Variation in short tandem repeat sequences a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. Int J Leg Med 1994; 107:13-20.

VAUHKONEN, H., VAUHKONEN, M., SIPPONEN, P., SAJANTILA, A. Correlation between the allelic distribution of STRs in a Finnish population and phenotypically different gastrointestinal tumours: a study using four X-chromosomal markers (DXS7423, DXS8377, ARA, DXS101). Ann Hum Genet 204; 68: 555-62.

VERZELETTI, A., CERRI, N., GASPARINI, F,, DE FERRARI, F. X-chromosome polymorphism on DXS8378,DXS7132, HPRTB and DXS723 loci in 130 individuals from Brescia (northern Italy).JLM. 2007; doi:10,106/j.legalmed.2006.11.001.

WIEGAND, P., BERGER, B., EDELMANN, J., PARSON, W. Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. Int J Legal Med 2003;117: 62-5.

ZARRABEITIA M, et al. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. FSI 2002; 129:85-89.

ZARRABEITIA, MT, et al. Analysis of six tetranucleotide polymorphisms of the X-chromosome in different Spanish regions. International Congress Series 2006; 1288:304-306.

_____, et al. Sequence structure and population data of two X-linked markers: DXS7423 and DXS8377. Int J Legal Med 2002; 116: 368-71.

_____, et al. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. Forensic Sci Int 2002; 129: 85-89.

ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANÁLISIS POBLACIONAL DEL CROMOSOMA X CON MARCADORES STRS EN UNA MUESTRA DE INDIVIDUOS DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER

CODIGO:_____ CIUDAD Y FECHA:_____

NOMBRE:_____ PARENTESCO:_____

IDENTIFICACIÓN:_____

DIRECCIÓN:_____ TELEFONO:_____

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:_____

Yo _____ identificado con _____ autorizo por medio de mi firma al laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander para que me realice la toma de dos muestras de sangre, una obtenida por venopunción y recolectada en un tubo vacutainer con EDTA y otra obtenida a partir de punción capilar recolectada en papel de filtro con el fin de ser utilizadas en estudios genéticos de filiación con marcadores STRs y para que los datos obtenidos a partir de este análisis puedan ser usados en la construcción de frecuencias poblacionales y demás parámetros estadísticos de importancia forense.

Doy constancia que he sido informado que el procedimiento para la obtención de las muestras no causa molestias mayores y va a ser realizado con todas las técnicas de asepsia y bioseguridad pertinentes. SI ____ NO___

Doy constancia que he sido informado acerca de los análisis genéticos que serán realizados a partir de las muestras obtenidas. SI ____ NO___

Doy consentimiento para el almacenamiento y conservación de las muestras al igual que para ser usadas en otras investigaciones relacionadas. SI ____ NO___

Autorizo además que los datos obtenidos en el análisis sean publicados en revistas científicas omitiendo cualquier dato que pueda revelar mi identidad. SI ____ NO___

_____ _____

FIRMA: Firma verificador

c.c