

**Universidad de Costa Rica  
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**Escuela de Biología**

**Licenciatura en Biología, con énfasis en Genética Humana**

**Trabajo Final de Graduación  
Proyecto de Graduación**

**“Estandarización del protocolo para las variantes alélicas observadas en  
una muestra costarricense del marcador autosómico D7S820”**

**Ana Victoria Sánchez Romero**

**2009**

## **Dedicación**

*El conocimiento es patrimonio de la humanidad, no es solo tuyo, trasmítelo para beneficio  
de toda la humanidad*

Anónimo

*La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad*

Gregorio Marañón

*Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos como descubrir nuevas formas  
de pensar sobre ellos*

William Lawrence Bragg

## Aprobación del Comité Asesor

---

Tutor:  
Dr. Ramiro Barrantes

---

Lector:  
Dr. Gustavo Gutiérrez

---

Lector:  
Dr. Alejandro Leal

---

Lector:  
Dr. Fabiola Herrera

---

Lector:  
M.Sc. Bernal Morera

---

Decana Facultad de Ciencias  
Dra. Virginia Solís

---

Sustentante:  
Lic. Ana Victoria Sánchez Romero  
Escuela de Biología, UCR

## **Agradecimientos**

Dr. Ramiro Barrantes

Msc. Ana Yanssy Morales

Dra. Martha Espinoza

Al personal de la Sección de Bioquímica del OIJ

Dra. Margaret Kline

Dr. Gustavo Gutiérrez

Dr. Alejandro Leal

Dra. Fabiola Herrera

A mi familia

Adriana Guillén

Laura García

Wendy Malespín

Mario Tellería

Lic. Gerardo Jiménez

Dra. Sandra Silva

# Índice General

## Contenido

Dedicatoria .....	xii
Comité asesor .....	xiii
Agradecimientos .....	xiv
Índice General .....	xv
Índice de Cuadros .....	xvii
Índice de Figuras .....	xviii
Resumen .....	xix
Abreviaciones .....	xxi
1. Introducción .....	1
1.1. Objetivos .....	4
1.1.1. General .....	4
1.1.2. Específicos .....	4
2. Revisión de Literatura .....	5
3. Metodología .....	9
3.1. Revisión de las investigaciones de paternidad .....	9
3.2. Extracción de ADN .....	9
3.3. Cuantificación de los extractos de ADN .....	10
3.4. Verificación de las supuestas variantes alélicas por amplificación con los “kits” comerciales AmpFlSTR®Identifiler® y PowerPlex®16 .....	10
3.5. Para confirmar la presencia de las variantes del D7S820, se llevó a cabo una amplificación por PCR de sólo el marcador D7S820 .....	11
3.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida y obtención de la banda de ADN de interés .....	12
3.7. Secuenciación de las variantes alélicas .....	13
3.8. Diseño de un iniciador para la secuenciación de dichas variantes alélicas ...	15
3.9. Estimación de la frecuencia alélica de las variantes en la población costarricense .....	16

4. Resultados y Discusión .....	17
4.1. Revisión de legajos, obtención de muestras y determinación de posibles variantes alélicas para el D7S820 .....	17
4.2. Amplificación de muestras con sólo los iniciadores del marcador D7S820 tanto los comerciales como los alternos y su visualización en geles de poliacrilamida .....	19
4.3. Secuenciación de los alelos OL en D7S820 .....	20
4.4. Estimación de la frecuencia alélica de las variantes en la población costarricense .....	21
5. Conclusiones .....	23
6. Referencias .....	25

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Número de casos de variantes alélicas observadas en el marcador D7S820 desde el 2004 al 2009, de las investigaciones de paternidades analizadas de rutina de la población costarricense en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del OIJ .....	17
<b>Cuadro 2.</b> Cálculo de las variantes alélicas observadas en el marcador D7S820 con los sistemas AmpFISTR®Identifiler® y PowerPlex®16.....	18
<b>Cuadro 3.</b> Descripción de los diferentes tamaños (en pares de bases) de los alelos OL observados en el marcador D7S820 para los sistemas AmpFISTR®Identifiler® y PowerPlex®16 .....	19
<b>Cuadro 4.</b> Descripción de los resultados de la secuenciación de las variantes alélicas, en donde se muestran los cambios observados en la secuencia del marcador D7S820.....	21
<b>Cuadro 5.</b> Cálculo de la variante alélica 8.2 observada en el marcador D7S820 .....	22

## Índice de Ilustraciones

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Visualización de alelos del D7S820 en geles de poliacrilamida .....	20



## Resumen

**Palabras clave:** STR, D7S820, variante alélica, PCR, secuenciación, investigaciones de paternidad

El presente trabajo determinó las variantes alélicas y su estructura del marcador D7S820 para una población costarricense observada, en investigaciones de paternidades analizadas de rutina en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial (OIJ). Este análisis será de gran utilidad para esta Sección pues podrá utilizar estas variantes alélicas como parte del análisis de cada paternidad. Para tal efecto, se analizó cada una de las variantes alélicas individualmente, mediante confirmación inicial de la muestra, seguido de la amplificación y secuenciación de la misma, considerando que las variantes alélicas que surgen en una población no pueden ser analizadas por el software disponible comercialmente, pues son leídos como alelos fuera del ámbito de tamaño esperado e inducen a errores de interpretación o dificultan la lectura de los resultados de las investigaciones de paternidad.

La muestra utilizada para el presente trabajo está constituida de los casos que llegan a la Sección de Bioquímica debido a investigaciones de paternidad desde el 2006 hasta el 2007, junto con los casos encontrados de los años 2004 al 2005 y del 2008 junto con los observados en el 2009, se realizó una revisión de 3776 casos y se utilizaron 37 muestras en las que se observó las variantes de interés.

Se encontraron tres variantes alélicas de interés, las cuales a continuación se describen junto con la estructura de la secuencia que poseen:

Alelo Designado	Largo del Fragmento (PP16) (pb)	Largo del Fragmento (ID) (pb)	5' Región Flanqueante (pb)	Región Repetida	3' Región Flanqueante (pb)		
6.3	214,53	258,78	24	(GATA) <sub>7</sub>	13	(T) <sub>8</sub> ATCT	124
9.1	224,42	268,41	24	(GATA) <sub>9</sub>	13	(T) <sub>10</sub> ATCT	124
10.3	231,19	274,14	24	(GATA) <sub>11</sub>	13	(T) <sub>8</sub> ATCT	124

Se logró establecer el protocolo necesario para realizar la determinación de las variantes alélicas 9.1 y 10.3 para el marcador D7S820, consiguiendo de esta manera la confirmación y la descripción de la estructura de cada una de las variantes alélicas del marcador, por medio de la secuenciación. En el caso de la variante 6.3 debe seguir mejorándose el protocolo para lograr una secuenciación limpia. El establecer las variantes alélicas es importante en el campo de la medicina y genética forense, pues permite aumentar el número de alelos disponibles del marcador y por lo tanto obtener un mejor perfil de identificación de los individuos analizados. Por otra parte, este proyecto permitió la aplicación práctica de los conocimientos adquiridos durante la licenciatura en genética humana, permitiendo así la culminación de los estudios de grado en este campo.

## **Abreviaciones**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**STR:** Short Tandem Repets, repeticiones pequeñas en tandem

**CODIS:** Combined DNA Index System

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismo de un solo nucleótido

**NIST:** National Institute of Standards and Technology

**OL:** Off Ladder, fuera de la escalera

**OIJ:** Organismo de Investigación Judicial

**PCR:** Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa

## 1. INTRODUCCIÓN

La comunidad de ADN forense se ha movido primariamente hacia el análisis de las repeticiones tetranucleótidas, las cuales pueden ser amplificadas usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una gran fidelidad de amplificación en comparación con las repeticiones dinucleótidas; aunque algunas repeticiones tri y pentanucleótidas también son usadas. La variedad de alelos presentes en una población es tal que un alto grado de discriminación entre individuos en una población puede ser obtenido cuando son examinados múltiples loci STR (repeticiones cortas en tandem) (Ruitberg *et al.* 2001).

A inicios de 1996, el laboratorio de la Oficina Federal de Investigaciones de Estados Unidos de América (Federal Bureau of Investigation, FBI) inició el establecimiento de un set uniforme de loci STR nucleares en territorio estadounidense, conocida como CODIS (Combined DNA Index System). Consiste en una base y banco de datos electrónico de perfiles de ADN, la cual también está implementada en otros países, que permite la identificación de sospechosos (The FBI DNA Laboratory 2004). Los trece sistemas genéticos pertenecientes al CODIS, se usan tanto en las pruebas de paternidad como en casos donde se cometió un delito. Estos STR son CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S538, D21S11, D18S51 y amelogenina para la determinación del sexo de las muestras. Estos loci son internacionalmente reconocidos como el estándar para la identificación en humanos. Si es requerido se cuenta con loci adicionales para sets de pruebas de STR más extensivos y poderosos (Butler 2006). La probabilidad de coincidencia al azar entre individuos no relacionados mediante el análisis de los 13 marcadores del CODIS es inferior a uno en mil millones (The FBI DNA Laboratory 2004)

La implementación de la marcación con fluorescencia de los iniciadores de PCR permite la multiplicidad de loci STR los cuales pueden tener alelos que se encuentran en el mismo ámbito de tamaño, pero con el marcaje de los loci traslapados con diferentes colores de los tintes de fluorescencia se puede resolver espectralmente. Entre los kits comerciales

de STR se encuentran disponibles: AmpFI STR® Identifiler™: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, Amelogenina, D5S818, FGA; y el PowerPlex® 16: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, Amelogenina, VWA, D8S1179, TPOX, FGA (Butler 2005, Butler y Mc Cord 2006)

Con cada uno de estos sistemas de identificación de polimorfismos puede establecerse un patrón o perfil de ADN. Los marcadores moleculares utilizados pueden ser considerados como de ocurrencia independiente y se heredan de generación en generación con lo que permiten establecer relaciones filiales además de vincular evidencias con sospechosos. Esta información se puede comparar fácilmente con otros de referencia o ya conocidos. Si se estudian suficientes marcadores genéticos, el perfil genético final puede ser relativamente único para cada individuo (Jeffreys y Tamakia 2005).

Los loci nucleares usualmente se emplean en pruebas de identificación humana y se demuestra su utilidad en la resolución de numerosos casos criminales y pruebas de paternidad desde hace más de una docena de años. La robustez de los kits de STR comerciales permite una amplificación confiable de estos loci nucleares desde pequeñas cantidades de ADN. Resultando en perfiles STR que permiten un alto poder de discriminación que puede ser lograda tanto entre individuos relacionados o no (Butler 2006). La uniformidad en grupos de loci de STR provee capacidad para intercambio de perfiles de ADN de criminales nacional e internacionalmente (Jeffreys y Tamakia 2005).

Los marcadores STR se han convertido en herramientas importantes para las pruebas de identificación y seguirán ampliando su uso en los años por venir, debido a su alto grado de variabilidad, su fácil uso en los formatos de amplificación multiplex y su implementación (Butler 2006).

La determinación de la relación biológica de paternidad, se basa en comparar los perfiles genéticos del presunto padre y del hijo(a). En pruebas que incluyen a la madre,

inicialmente se comparan los perfiles del ADN de la madre y el niño. Esta comparación demostrará el cotejo entre la madre y el niño para uno de los alelos. Sabiendo qué alelos procedieron de la madre, se deducen cuáles tienen que haber sido heredados de su padre biológico (Rocabado 2004). Estos alelos son llamados “paternos obligatorios” porque el verdadero padre biológico debe tenerlos en su perfil del ADN, y son los que el niño heredó de él. El perfil del ADN del padre alegado es comparado con los alelos del niño (Poyatos y Morer 2008).

Si la prueba es de tipo legal, el resultado de la prueba se puede o se requiere usar como evidencia en juicios. Requiere identificación de las muestras y cadena de custodia para poder sostenerla como evidencia legítima. Los peritos del laboratorio deben acudir a los Tribunales a ratificar los resultados y las conclusiones, si así lo solicita el mismo (Poyatos y Morer 2008).

La prueba de ADN de paternidad proporciona una respuesta inequívoca. Si el supuesto padre es el verdadero padre biológico, la prueba de paternidad lo confirmará con una probabilidad superior al 99,99%. En cambio, si el supuesto padre no es el padre biológico, se descarta la paternidad con una seguridad del 100%. En la actualidad, las normas internacionales plantean una exigencia de “probabilidad de paternidad” igual o superior al 99,9% para considerar la paternidad como “prácticamente probada (Sozer *et al.* 1997, Poyatos y Morer 2008).

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo General:**

Estandarizar el protocolo para las variantes alélicas correspondientes del marcador autosómico D7S820 para el caso de Costa Rica, una técnica con fines de aplicación forense en el laboratorio de Genética Forense de la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, con el propósito de determinar la paternidad o excluirla.

### **1.1.2 Objetivos Específicos:**

- A. Determinar cuáles son las variantes alélicas del marcador D7S820 que se encuentran en la población costarricense.
- B. Secuenciar dichas variantes alélicas, para lograr establecer cuál es su estructura.
- C. Diseñar un iniciador para la secuenciación de dichas variantes alélicas.
- D. Confirmar la paternidad o no de los casos en estudio.
- E. Estimar la frecuencia poblacional de las variantes alélicas del marcador D7S820.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los seres humanos somos en un 99,9 % genéticamente idénticos, es decir, la secuencia de nucleótidos que componen nuestros ácidos nucleicos solo difiere en un 0.1 %. Si bien esta cantidad es mínima expresada como porcentaje, en cantidad neta adquiere otra dimensión y puede pensarse de la siguiente manera: existen 3 millones de nucleótidos en nuestro ADN que están ordenados de una forma particular en cada individuo y nos diferencian. Estas diferencias no están distribuidas al azar, sino que se hallan en regiones específicas. La identificación de estas zonas permite establecer a estas diferencias como una huella genética individual (Butler 2005).

Esta propiedad de diversidad del ADN que presenta variaciones en los distintos individuos de la población, es una característica que ofrece la posibilidad de obtener un código genético identificador que teóricamente permite distinguir de forma precisa a cada individuo de una población (con la excepción de los gemelos idénticos o uni-vitelinos). Las zonas del ADN que presentan mayor variabilidad entre los individuos de la población son las regiones de ADN repetitivo (no codificante) (Butler 2005).

Las secuencias de repeticiones en tandem de ADN se encuentran ampliamente dispersas por el genoma humano y muestran variabilidad suficiente entre individuos en una población, por lo cual se han vuelto importantes en varios campos que incluyen el mapeo genético, análisis de ligamiento y en las pruebas de identificación en humanos. (Jobling y Gill 2004). Los microsatélites (repeticiones cortas en tandem, STR) contienen 2-5 pb repetidas (Ruitberg *et al.* 2001), entre sus características se encuentran que son muy variables, altamente polimórficos, muy abundantes, están distribuidos por todo el genoma y son de herencia codominante (se distinguen todos los homocigotos entre sí y estos de los heterocigotos) (Kline *et al.* 2001, Butler 2005). Lo que lo hace ser muy eficientes para aplicaciones en estudios poblacionales.



La comunidad genética forense ha puesto en uso, estandarizado y aprobado los marcadores STR de la base de datos estadounidense denominada CODIS (Combined DNA Index System) (Butler 2005). Se han convertido en la tecnología elegida para las bases de datos en todo el mundo, puesto que ofrecen análisis más específicos y más rápidos; y funcionan por el análisis de los patrones de repetición en varias localizaciones del genoma humano (loci). Analizando los patrones de repetición en varios loci, los científicos pueden identificar individuos o perfiles de ADN en forma definitiva (Jobling y Gill 2004).

Los loci nucleares usualmente se emplean en pruebas de identificación humana y se demuestra su utilidad en la resolución de numerosos casos criminales y pruebas de paternidad desde hace más de una docena de años. La robustez de los “kits” de STR comerciales permite una amplificación confiable de estos loci nucleares a partir de pequeñas cantidades de ADN. Los perfiles STR permiten un alto poder de discriminación que puede ser lograda tanto entre individuos relacionados o no (Butler 2006). La uniformidad en grupos de loci de STR provee capacidad para intercambio de perfiles de ADN de criminales, nacional e internacionalmente (Jeffreys y Tamakia 2005). Los marcadores STR se han convertido en herramientas importantes para las pruebas de identificación y seguirán ampliando su uso en los años por venir, debido a su alto grado de variabilidad, su fácil uso en los formatos de amplificación multiplex y su implementación (Butler 2006).

En varios casos los loci que presentan una tripleta como núcleo de su repetición se encuentran asociados con varios desordenes genéticos, asimismo se relaciona con la posibilidad de un crecimiento rápido del tamaño del alelo. Estimaciones generales de las tasas de mutación dependen del largo de la repetición consenso. Esto es importante para las pruebas de paternidad con una aparente exclusión paternal, por lo cual se debe tener en cuenta la posibilidad de una mutación en la transmisión del gen. La tasa de mutación de los microsatélites a menudo se sitúa en un ámbito de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  por locus por generación, mientras que para los SNPs (polimorfismo de un solo nucleótido) se ha considerado casi despreciable ( $10^{-8}$ ) en términos prácticos (Sobrino *et al.* 2005). Las tasas de mutación en

microsatélites tienen influencia sobre la estructura y el largo de la repetición en tandem. Las mutaciones en microsatélites constituyen una parte significativa de todas las mutaciones en el genoma que son transferidas de una generación a otra (Aşıcıoğlu *et al.* 2004).

El genotipo de STR típicamente se lleva a cabo utilizando comparaciones de tamaños de la muestra con escaleras alélicas estandarizadas que poseen los alelos más comunes, que han sido secuenciados para obtener el verdadero número de repeticiones. Los diferentes “kits” manufacturados de STR pueden suplir escaleras alélicas con ámbitos de alelos ligeramente diferentes (Butler 2006).

Los alelos microvariantes son alelos que no son múltiplos exactos de la repetición básica o variantes de secuencia de la repetición o ambos. Los alelos con unidades repetitivas parciales son designados por el número de repeticiones completas y luego un punto decimal seguido del número de bases en la repetición parcial

A medida que más muestras se realicen con loci STR, nuevos alelos son descubiertos constantemente, que no poseen el tamaño exacto con la escalera alélica. Estos alelos fuera de la escalera, pueden ser variantes con más o menos de la repetición central que presentan los alelos comunes encontrados en las escaleras alélicas disponibles comercialmente. Alternativamente, estas variantes alélicas pueden contener repeticiones parciales o inserciones/deleciones en la región flanqueante de la repetición (Butler 2006).

Ocasionalmente una variante alélica puede ocurrir con un tamaño entre dos loci en un electroferograma de STR multiplex, la asignación de esa variante a un locus apropiado se dificulta, lo cual se logra de una mejor manera en una amplificación del locus individual (Grubwieser *et al.* 2005). Los diferentes “kits” de STR disponibles de las compañías Promega y Applied Biosystems, poseen ensambles de loci en diferentes configuraciones en términos de tamaño y pueden ser usados en algunos casos para una efectiva asignación de un alelo inusual para el locus apropiado. Alternativamente, los iniciadores de locus STR

solo se encuentran disponibles por parte de la Corporación Promega, o pueden ser sintetizados basándose en la información del locus específico que se encuentra disponible, para una efectiva asignación de la variante alélica (Butler 2006).

El marcador D7S820 utilizado en este proyecto, se encuentra localizado en el cromosoma 7, en el brazo largo del cromosoma en la región 21.11 y su número de acceso en el GeneBank es G08616 (con 12 repeticiones) y AC004848 (con 13 repeticiones). Este marcador posee la unidad repetitiva GATA, donde el número de repeticiones va desde 5 hasta 15, con un peso que se encuentra desde los 211 pb hasta 251 pb respectivamente; según la información suministrada por la base de datos de internet de las repeticiones cortas en tándem de la NIST (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/index.htm>).

Las variantes alélicas que surgen en una población no pueden ser analizadas por el software disponible comercialmente, pues son leídos como alelos fuera del ámbito de tamaño esperado e inducen a errores de interpretación o dificultan la lectura de los resultados de las investigaciones de paternidad. El presente trabajo determinó las variantes alélicas del marcador D7S820 junto con la estructura de la misma, para la población costarricense observada en las muestras de paternidades analizadas de rutina en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, el cual será de gran utilidad para esta Sección pues podrá hacer uso de las variantes alélicas para el marcador D7S820 como parte del análisis de cada paternidad. Para esto se analizó cada una de las variantes alélicas individualmente, mediante confirmación inicial de la muestra, seguido de la amplificación y secuenciación de la misma.

La muestra utilizada para el presente trabajo está constituida de los casos que llegan a la Sección de Bioquímica debido a investigaciones de paternidad desde el 2006 hasta el 2007, junto con los casos encontrados de los años 2004 al 2005 y del 2008 con los

observados en el 2009. Se realizó una revisión de 3776 casos y se utilizaron 37 muestras en las que se observó las variantes de interés.

A continuación se describe el método utilizado para lograr el objetivo anteriormente citado de este proyecto de graduación.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Revisión de las investigaciones de paternidad.**

Lo anterior se realizó desde el 2006 hasta el 2007, para así determinar los casos que presenten posibles variantes alélicas para D7S820 lo cual se llevó a cabo examinando todos los legajos correspondientes a ese periodo de tiempo, tanto de paternidades confirmadas como de las excluidas. Adicionalmente se contaba con diecinueve casos de posibles variantes alélicas de los años 2004, 2005, 2008 y 2009.

#### **3.2 Extracción de ADN.**

El proceso de extracción se llevó a cabo a partir de la sangre impregnada en papel de filtro FTA de Whatman®, del cual se procedió a recortar tres círculos de 2 milímetros de diámetro. Estos se depositaron en microtubos de 1.5 ml a los que se les agregó 1 ml de agua destilada; se dejaron en reposo a temperatura ambiente por una hora. Al cumplirse el tiempo se procedió a centrifugar las muestras a 14000 xg por 5 minutos y se extrajo el agua sin remover el botón. Seguidamente, se le agregó 100 µl de resina Chelex al 5% y se colocó en incubación por 30 minutos a 56°C,

luego se agitaron las muestras y se colocaron en un baño María por 12 minutos, por último se realizó una corta centrifugación y las muestras se guardaron a 4°C.

### 3.3 Cuantificación de los extractos de ADN.

A las muestras extraídas se les realizó una cuantificación por medio de una PCR en tiempo real con el protocolo de Quantifiler® Human DNA y se usó el 7500 RT PCR (Applied Biosystems). Se utilizó como control positivo K562 DNA (Promega Corporation) y como control negativo agua destilada.

### 3.4 Verificación de las supuestas variantes alélicas por amplificación con los “kits” comerciales AmpFISTR®Identifiler® y PowerPlex®16.

Se procedió a corroborar los perfiles que fueron reportados inicialmente, las muestras se reamplificaron haciendo uso de los protocolos e indicaciones establecidas por el kit de AmpFISTR®Identifiler® (Applied Biosystems) y el kit de PowerPlex®16 (Promega Corporation). Se utilizó como control positivo K562 DNA (Promega Corporation), el cual amplifica los alelos 11/9 del D7S820 y como control negativo agua destilada.

La PCR se realizó en el termociclador PE 9700. La electroforesis capilar se realizó en el secuenciador ABI 3130 y el análisis de los resultados se hizo con el software GeneMapper ID v3.2., en donde se obtiene el tamaño en pares de bases de los alelos observados. La designación de alelos se realizó según las recomendaciones de la Comisión de ADN de la ISFG (1994) con la ayuda de las escaleras alélicas provistas por las compañías.

A partir de los electroferogramas se precisó si existían o no variantes alélicas, pues éstas son asignadas como alelos “fuera de la escalera” (OL, por sus siglas en inglés)

y al confirmarse su presencia se determinó en pares de bases, para así establecer a cual variante hace referencia. Con la información del tamaño de los alelos, en pares de bases, se puede establecer la designación de los alelos fuera del ámbito de la escalera comercial, utilizando una fórmula descrita por J. Buttler (2005):

$$\delta_1 = S_1 - L_1$$

$$\delta_2 = S_{OL} - L_2$$

$$c = | \delta_1 - \delta_2 |$$

Donde  $\delta_1$  es el resultado de la diferencia entre el peso en pares de bases de un alelo conocido y el valor del mismo en la escalera alélica,  $\delta_2$  corresponde a la diferencia entre el peso del OL y el valor en la escalera más cercano a este OL. Finalmente  $c$  es el valor absoluto de la diferencia entre  $\delta_1$  y  $\delta_2$ , que significa a cuál distancia en pb está el OL del valor de referencia de la escalera.

A partir de la información dada por la fórmula de las variantes alélicas, se realizó una búsqueda en las bases de datos a nivel mundial de STR y así determinar la existencia o no de la o las variantes alélicas y poder de esta manera establecer qué información existe sobre dicha variante.

3.5 Para confirmar la presencia de las variantes del D7S820, se llevó a cabo una amplificación por PCR de sólo el marcador D7S820.

La amplificación se realizó utilizando PowerPlex® 16 Monoplex System D7S820 (Promega Corporation). Los iniciadores para la amplificación del D7S820 utilizados fueron Fwd: ATGTTGGTCAGGCTGACTATG y el Rev: GATTCCACATTTATCCTCATTGAC. Siempre se utilizó un control positivo K562 DNA y uno negativo de agua destilada para cada amplificación.

Para efectuar la PCR se preparó un *master mix*, donde se tomaron 150  $\mu$ l de Buffer Gold STR 10X (Promega), 1085  $\mu$ l de agua y 15  $\mu$ l de Taq polimerasa; a partir de

este mix se tomó 47.5  $\mu$ l y se agregó 1.5  $\mu$ l de una preparación 1:1 (F 20 $\mu$ M y R 20 $\mu$ M) de cada iniciador por cada tres muestras. Por cada reacción de PCR se agregó 13.5  $\mu$ l de *master mix* y 2 ng del extracto de ADN.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador PE 9700, con los siguientes tiempos y temperaturas de ciclado: inicialmente 2 minutos a 96°C, 10 ciclos (1 minuto a 94°C, un minuto y medio a 60°C y 1 minuto y 45 segundos a 70°C), luego 20 ciclos (un minuto a 90°C, minuto y medio a 60°C y 1 minuto y 45 segundos a 70°C) finalmente 30 minutos a 60°C y a 4°C por un período indefinido.

Se realizó una verificación de la amplificación, por medio de un gel de agarosa al 1% (0.43 gr de agarosa, 43 ml de buffer TE 0.5X) teñido con bromuro de etidio (4.3  $\mu$ l), se tomaron 2.5  $\mu$ l de los productos de amplificación junto con 5  $\mu$ l de buffer de carga; el cual se corrió por una hora a 100W; seguidamente se expuso a luz ultravioleta para su visualización.

3.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida y obtención de la banda de ADN de interés.

La electroforesis se efectuó en geles verticales de poliacrilamida desnaturalizante de 0.4 mm de espesor al 4% (45 ml de urea (7M), 6 ml de buffer TBE 10x y 6 ml de poliacrilamida al 40%, aforado con agua destilada a un volumen de 60 ml). Se agregó 2.5  $\mu$ l de producto de PCR a 2.5  $\mu$ l de buffer de carga y se desnaturalizó por 5 minutos a 95°C seguido de choque térmico en una cama de hielo. A cada pozo se le agregó 3.5  $\mu$ l de la preparación anterior, las condiciones de corrida fueron 60W durante una hora y media.

La detección de los productos amplificados se realizó mediante la tinción con sales de plata. Una vez concluida la electroforesis, se colocó el gel en agitación en una bandeja con 1 L de ácido acético al 10% durante 20 minutos. Posteriormente se

llevó a cabo tres lavados con agua destilada de 2 minutos cada uno. La impregnación con sales de plata (1 L  $\text{AgNO}_3$  1g/l y 1.5 ml de formaldehído) se realizó en agitación constante durante 30 minutos. Luego de un lavado rápido en agua destilada, se reveló el gel hasta obtener la tinción deseada (1 L de  $\text{NaCO}_3$  30g/l, 1.5 ml de formaldehído y 200  $\mu\text{l}$  de tiosulfato de sodio al 0,1%).

Luego de la electroforesis y detección del producto de la PCR, las bandas que contenían los fragmentos de ADN de interés, se cortaron del gel, con una navaja estéril y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 0.5  $\mu\text{l}$  junto con 40  $\mu\text{l}$  de buffer TE (10mM Tris, pH 8.0; 0.1mM EDTA) y se colocaron en un baño a 85°C durante 15 minutos de acuerdo con el protocolo de Lazaruk *et al.*, 2001.

### 3.7 Secuenciación de las variantes alélicas.

Se procedió a la reamplificación con 3  $\mu\text{l}$  de la banda de ADN obtenida en el gel de poliacrilamida. La reamplificación se corroboró en geles de agarosa al 1% junto con la escalera de peso molecular, las bandas de un peso alrededor de 200 a 250 pb fueron las utilizadas para la secuenciación.

Previo a la secuenciación se purificó el producto amplificado con 2  $\mu\text{l}$  de ExoSAP-IT® (USB) con una incubación a 37°C durante 15 minutos y una segunda incubación a 80°C durante 15 minutos. El producto reamplificado y purificado se diluyó 1:3 con buffer TE para proceder a la reacción de secuenciación, a la cual se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de esa dilución.

La secuenciación se realizó con BigDye®Terminator v1.1, tanto en dirección 3' como 5' de acuerdo con las condiciones del fabricante en los termocicladores Veriti™ y PE 9700. Como control negativo se utilizó agua destilada. Para cada secuenciación se utilizó un alelo conocido del marcador D7S820 como control positivo. La precipitación del producto secuenciado se realizó tanto con el



protocolo de EDTA y etanol como con el producto Big Dye XTerminator de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems). En el caso de la precipitación con EDTA y etanol, las muestras se resuspendieron en 17 µl de formamida.

La electroforesis capilar se realizó en el analizador genético ABI 310 y las secuencias se analizaron con el software SeqScape™ v2.5 (Applied Biosystems). Como plantilla para el análisis de las secuencias se utilizó la secuencia reportada en el Genbank con el número de acceso G08616 correspondiente a 12 repeticiones, como se muestra a continuación:

TGCAACCTCCTCCTCCCGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTACCTGGGATTACAGGCACAT  
GCCACCACCCCAAGTAATTTTTTTGTATTATTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGATCTC  
AGACTCCTACCTCAAGTGATCCACCTGCTTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCGCA  
CCTGACCCCTATGGAATTTTTTTGTTTGTGTTTTATTTATTTCTTTATCTTGAGATGGAGTCTCACTCTGT  
CACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCTTCTGGGTCAAGTGGTTCTCC  
TGCCCCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCATGTGCTACTGCATCCAGCTAATTTTTGTATTTTTTTA  
GAGACGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGACTATGGAGTTATTTAAGGTTAATATATATAAAGGGTAT  
GATAGAACAACCTTGTCATAGTTTAGAACGAACCTAAC**GATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT**  
**AGATAGATAGATAGATAGATA**GACAGATTGATAGTTTTTTTTAATCTCACTAAATAGTCTATAGTA  
AACATTTAATTACCAATATTTGGTGCAATTCTGTCAATGAGGATAAATGTGGAATCGTTATAATTCTTAAGAA  
TATATATCCCTCTGAGTTTTTGATACCTCAGATTTTAAGACCTCACAATTATCTCATAAGGCTTAAAATCAAT  
CATATTTTGAGGATCAACTTATGGTATTTTTGCCTGTTTTTATCCTTCTGGTGTGAAAACCTGATGCCTTCCAT  
CGTGTAACCTCTTGTTCACTGGTTTCAGTATTTGTTTTGTTTTGTTTTCTGGCTTTTTAACAGCAAAATGCA  
CAAATTATGAAAACCTCATATTAAGCTCATTAGAACACAATTGTTACATCCAGTTAGCATATAAGTCATTTTCT  
AAAACCTAATGGCAAAATTGGATCTTTCCAGTCTCAAATTATAAGAAGCATTAACTCTGAGACTGCATCAA

Se diseñaron varias plantillas de referencia para el uso del software que analizó las secuencias, las plantillas solo difieren entre sí, por la cantidad de repeticiones

GATA (de 6 a 12), lo que permitió el ensamblaje y el análisis adecuado de cada alelo.

### 3.8 Diseño de un iniciador para la secuenciación de dichas variantes alélicas.

Se diseñó un par de nuevos iniciadores utilizando el programa en línea Primer3 (v. 0.4.0) de Rozen y Skaletsky (2000), se tomó en cuenta para el diseño, el que el nuevo par de iniciadores contuviera la secuencia de los iniciadores de la casa comercial Promega y a la vez abarcara una región más amplia tanto hacia el extremo 5' como el 3', pues queríamos estar seguros que no hubiera cambios de la secuencia antes o en el inicio del marcador así como en el final o después del mismo, dando como resultado los siguientes iniciadores, Fwd: CCTGACCCCCTATGGAATTT y el Rev: GCCAGAAAACAAAACAAAACAA.

A continuación se muestra, lo anteriormente explicado, donde las zonas con letras en negrita y cursiva son los iniciadores nuevos, las resaltadas con gris son los iniciadores comerciales y la zona con las letras subrayadas contienen a todo el marcador D7S820.

TGCAACCTCCTCCTCCCGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTACCTGGGATTACAGGCACAT  
GCCACCACCCCAAGTAATTTTTTTGTATTATTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGATCTC  
AGACTCCTACCTCAAGTGATCCACCTGCTTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACCGCA  
***CCTGACCCCCTATGGAATTT***TTTTGTTGTTTGTTTTTATTTATTTCTTTATCTTGAGATGGAGTCTCA  
CTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGCATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCTTCTGGGTCAAGTGG  
TTCTCCTGCCCCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGCATGTGCTACTGCATCCAGCTAATTTTTGTATT  
TTTTTAGAGACGGGGTTTCACC***ATGTTGGTCAGGCTGACTATG***GAGTTATTTAAGGTTAATATATA  
TAAAGGGTATGATAGAACACTTGTTCATAGTTTAGAACGAACTAACGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGATTGATAGTTTTTTTTAATCTCACTAAATAGTCTATAGTAAACATT  
TAATTACCAATATTTGGTGCAATTCT***GTCAATGAGGATAAATGTGGAATC***GTTATAATTCTTAAGA

ATATATATCCCTCTGAGTTTTTGATACCTCAGATTTTAAGACCTCACAATTATCTCATAAGGCTTAAAATCAA  
TCATATTTTGAGGATCAACTTATGGTATTTTTGCCTGTTTTATTCTTCTGGTGTGAAAAGCTGATGCCTCCA  
TCGTGTAAGCTCTGTTCACACTGGTTTCAGTATTTTGTT**TTGTTTTGTTTTCTGGC**TTTTTAACAGCAAA  
ATGCACAAATTATGAAACTCATATTAAGCTCATTAGAACACAATTGTTACATCCAGTTAGCATATAAGTCAT  
TTTCTAAAATAATGGCAAAATTGGATCTTCCAGTCTCAAATTATAAGAAGCATTAACTCTGAGACTGCAT  
CAA

Para efectuar la PCR se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito para los iniciadores monoplex de la casa Promega Corporation.

Luego se procedió con la electroforesis en geles de poliacrilamida y obtención de la banda de ADN de interés y luego con la secuenciación de las variantes alélicas, siguiendo los métodos anteriormente descritos. La diferencia de estos iniciadores con los comerciales está en el tamaño del fragmento de ADN que se obtiene, en los iniciadores alternos el tamaño es mayor casi 900 pb comparado con los casi 300 pb de los iniciadores comerciales.

3.9 Estimación de la frecuencia alélica de las variantes en la población costarricense.

Se determinó la frecuencia de las variantes alélicas del marcador D7S820 en la muestra de la población costarricense. Esta frecuencia se obtuvo por la división de la cantidad de observaciones individuales (individuos no emparentados) entre la totalidad de casos analizados.

Todo el trabajo anteriormente descrito se llevó a cabo en su totalidad en la Sección de Bioquímica, Organismo de Investigación Judicial. Se hizo uso de los equipos, reactivos y materiales necesarios, junto con la colaboración de su personal. Además todas las muestras

de los individuos involucrados se trataron con completa confidencialidad. Las muestras fueron entregadas y custodiadas por el personal de la Sección.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Revisión de legajos, obtención de muestras y determinación de posibles variantes alélicas para el D7S820

A través de una revisión de los legajos se encontraron los siguientes casos con posibles variantes alélicas, donde la asignación del peso en pares de bases se realizó para los OLs en los sistemas AmpFlSTR®Identifiler® y PowerPlex®16 y a las mismas se les aplicó la fórmula descrita por J. Buttlar (2005).

**Cuadro 1.** Número de casos de variantes alélicas observadas en el marcador D7S820 desde el 2004 al 2009, de las investigaciones de paternidades de la población costarricense analizadas de rutina, en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del OIJ.

	Número de casos observados por año						
Variante Alélica	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
<b>6.3</b>	3*	1*	1*	6*	5	4*	20
<b>9.1</b>	1*	1				1	3
<b>10.3</b>				3	1	1	5

\* Se observó transmisión de la variante alélica de padre/madre a hijo

**Cuadro 2.** Cálculo de las variantes alélicas observadas en el marcador D7S820 con los sistemas AmpFlSTR®Identifiler® y PowerPlex®16

Muestra	Genotipo	OL	Pb S	Pb L	$\delta_1$	Pb OL	Pb L	$\delta_2$	c	Variante
16	12-OL	10	236,09	236,13	-0,04	231,02	228,07	2,95	2,99	10,3
18	8-OL	10	263,47	263,95	-0,48	268,49	272,06	-3,57	3,09	10,3
24	14-OL	10	287,90	288,26	-0,36	274,56	271,9	2,66	3,02	10,3
29	12-OL	10	237,44	237,6	-0,16	232,22	235,39	-3,17	3,01	10,3
37	13-OL	10	239,35	239,41	-0,06	230,34	227,31	3,03	3,09	10,3
7	9-OL	9	223,88	223,9	-0,02	223,88	225,1	-1,22	1,2	9,1
8	11-OL	9	231,92	232,16	-0,24	224,86	224,05	0,81	1,05	9,1
9	11-OL	9	231,85	232,04	-0,19	224,78	223,9	0,88	1,07	9,1
35	11-OL	9	231,26	231,21	0,05	224,15	223,25	0,90	0,85	9,1
1	12-OL	6	236,04	236,02	0,02	214,72	211,78	2,94	2,92	6,3
2	11-OL	6	231,94	232,04	-0,10	214,74	211,78	2,96	3,06	6,3
3	8-OL	6	219,90	219,90	0,00	214,83	211,78	3,05	3,05	6,3
4	12-OL	6	236,10	236,02	0,08	214,87	211,78	3,09	3,01	6,3
5	12-OL	6	235,94	236,14	-0,20	214,69	211,85	2,84	3,04	6,3
6	10-OL	6	227,91	227,93	-0,02	214,75	211,85	2,90	2,92	6,3
10	11-OL	6	231,91	232,04	-0,13	214,71	211,78	2,93	3,06	6,3
11	12-OL	6	236,11	236,02	0,09	214,76	211,78	2,98	2,89	6,3
12	10-OL	6	227,92	228,07	-0,15	214,87	211,95	2,92	3,07	6,3
13	10-OL	6	227,99	228,07	-0,08	214,90	211,95	2,95	3,03	6,3
14	12-OL	6	236,09	236,02	0,07	214,88	211,95	2,93	2,86	6,3
15	11-OL	6	231,89	232,16	-0,27	214,86	211,95	2,91	3,18	6,3
17	10-OL	6	227,86	228,07	-0,21	214,88	211,95	2,93	3,14	6,3
19	7-OL	6	259,26	259,50	-0,24	258,25	255,45	2,80	3,04	6,3
20	12-OL	6	236,19	236,13	0,06	214,93	211,95	2,98	2,92	6,3
21	10-OL	6	228,07	228,07	0,00	214,93	211,95	2,98	2,98	6,3
22	10-OL	6	227,80	228,07	-0,27	214,75	211,95	2,80	3,07	6,3
23	11-OL	6	231,88	232,04	-0,16	214,73	211,78	2,95	3,11	6,3
30	12-OL	6	235,42	235,56	-0,14	214,21	211,27	2,94	3,08	6,3
25	11-OL	6	276,71	276,8	-0,09	259,31	256,35	2,96	3,05	6,3
27	10-OL	6	272	272,04	-0,04	258,81	255,8	3,01	3,05	6,3
28	12-OL	6	280,24	280,5	-0,26	258,83	256,04	2,79	3,05	6,3
26	8-OL	6	264,05	264,23	-0,18	258,96	256,05	2,91	3,09	6,3
31	11-OL	6	231,34	231,35	-0,01	214,19	211,20	2,99	3,00	6,3
32	9-OL	6	223,34	223,30	0,04	214,17	211,25	2,92	2,88	6,3

33	12-OL	6	235,40	235,39	0,01	214,17	211,25	2,92	2,91	6,3
34	12-OL	6	235,32	235,34	-0,02	214,08	211,11	2,97	2,99	6,3
36	9-OL	6	223,41	223,36	0,05	214,21	211,26	2,95	2,90	6,3

Pb S: Pares de bases del alelo conocido

Pb L: Pares de bases del alelo en la escalera alélica.

Pb OL: Pares de bases del alelo OL

$\delta_1$ : Diferencia entre el peso del alelo conocido y el del alelo la escalera alélica

$\delta_2$ : Diferencia entre el peso del alelo OL y el del alelo de referencia de la escalera alélica

c: distancia en pb a la cual está el OL del valor de referencia de la escalera

A continuación se presenta el peso en pares de bases en los sistemas de secuenciación que posee la Sección de Genética del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial.

**Cuadro 3.** Descripción de los diferentes tamaños (en pares de bases) de los alelos OL observados en el marcador D7S820 para los sistemas AmpFISTR®Identifiler® y PowerPlex®16

Variante	PowerPlex®16 v1.3		AmpFISTR®Identifiler® v1	
	Peso Promedio	Desviación estándar	Peso Promedio	Desviación estándar
6.3	214,53	0,33	258,78	0,39
9.1	224,42	0,48	268,41	0,41
10.3	231,19	0,95	274,14	0,57

#### 4.2 Amplificación de muestras con sólo los iniciadores del marcador D7S820 tanto los comerciales como los alternos y su visualización en geles de poliacrilamida

Primero se utilizaron los iniciadores comerciales de casa Promega Corporation (Fdw: ATGTTGGTCAGGCTGACTATG y Rev: GATCCACATTTATCCTCATTGAC) para amplificar las muestras y determinar si con éstos se podía observar el o los cambios en la secuencia del marcador para todas las muestras. Igualmente, se aplicó el mismo procedimiento para los iniciadores alternativos (Fwd: CCTGACCCCCTATGGAATTT y el Rev: GCCAGAAAACAAAACAAAACAA). Para los iniciadores alternos se obtuvo una secuencia de mayor tamaño que incluía a los iniciadores comerciales.



**Figura 1.** Visualización de alelos del D7S820 en geles de poliacrilamida. A la izquierda se observa la escalera alélica. Debajo de cada alelo rotulado, se observa una banda adicional, la cual se asocia al tartamudeo de la polimerasa. Con la colaboración de la Dra. Sandra Silva.

#### 4.3 Secuenciación de los alelos OL en D7S820.

Luego de obtener las bandas de los geles de poliacrilamida y al reamplificar las mismas, se procedió a realizar la secuenciación de los alelos OL en D7S820, lo que permitió determinar el o los cambios en la secuencia. Para ambos pares de iniciadores, comerciales y alternos, se observaron los mismos cambios en las secuencias, sólo con la diferencia del tamaño del fragmento que se secuenció, donde el par de iniciadores alternos produjo un fragmento de mayor tamaño. Para la secuenciación del alelo 6.3 se contó con la

colaboración de la Dr. Margaret Kline del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología en Estados Unidos.

**Cuadro 4.** Descripción de los resultados de la secuenciación de las variantes alélicas, en donde se muestran los cambios observados en la secuencia del marcador D7S820.

Alelo Designado	Largo del Fragmento (PP16) (pb)	Largo del Fragmento (ID) (pb)	5' Región Flanqueante (pb)	Región Repetida	3' Región Flanqueante (pb)		
<b>6*</b>	211,78	255,17	24	(GATA) <sub>6</sub>	13	(T) <sub>9</sub> ATCT	124
<b>6.3</b>	214,53	258,78	24	(GATA) <sub>7</sub>	13	(T) <sub>8</sub> ATCT	124
<b>9*</b>	223,9	267,3	24	(GATA) <sub>9</sub>	13	(T) <sub>9</sub> ATCT	124
<b>9.1</b>	224,42	268,41	24	(GATA) <sub>9</sub>	13	(T) <sub>10</sub> ATCT	124
<b>10*</b>	227,93	271,4	24	(GATA) <sub>10</sub>	13	(T) <sub>8</sub> AATCT	124
<b>10.3</b>	231,19	274,14	24	(GATA) <sub>11</sub>	13	(T) <sub>8</sub> ATCT	124

\*El alelo 6, 9 y 10 son alelos de referencia.

PP16: PowerPlex®16

ID: AmpFISTR®Identifiler®

Pb: pares de bases

#### 4.4 Estimación de la frecuencia alélica de las variantes en la población costarricense.

Durante el año 2006 se realizaron 1746 investigaciones de paternidades en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, donde 1127 fueron inclusiones y 619 exclusiones, durante este periodo solo se observó un caso de variante alélica, el 6.3, de una madre, la cual fue transmitida a sus dos hijos; por lo cual la frecuencia de dicha variante durante el 2006 fue de 0,000573. Para el año 2007 se efectuaron 2030 paternidades, de las cuales 1295 fueron inclusiones y 735 exclusiones, durante este año se hallaron ocho variantes alélicas, y entre ellos dos variantes 10.3 y seis del 6.3, y hubo un caso de transmisión de variante alélica de madre a hijo. Las frecuencias alélicas respectivamente fueron 0,000985 y 0,00296 y una frecuencia alélica de variantes totales del 0,00394 para el año 2007.



Una vez concluido con el trabajo realizado en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, se observó la variante alélica 8.2 en el marcador D7S820, el cual queda pendiente de secuenciar por el personal de la Sección. A continuación se describe la misma:

**Cuadro 5.** Cálculo de la variante alélica 8.2 observada en el marcador D7S820

Muestra	Genotipo	OL	Pb S	Pb L	$\delta_1$	Pb OL	Pb L	$\delta_2$	c	Variante
38	13-OL	8	239,33	239,26	0,07	221,11	219,02	2,09	2,02	8.2

Todas las variantes observadas siguieron el patrón observado por Egyed *et al.* (2000), el cual predice que para los x.3 y x.1, en la mayoría de los casos reportados, son el resultado de la variación en el número de T encontradas en un segmento de poli(T) 13 bases corriente abajo de la repetición GATA. Los alelos que se encuentran en los ámbitos de las escaleras comerciales contienen 9(T) o pueden cambiar una (T) por una (A), quedando con 8(T) y 2(A), como el alelo 10 observado en el cuadro 4. Las variantes alélicas x.3 contienen 8(T) y los alelos x.1 contienen 10(T).

No se pudo obtener una secuencia limpia de la variante 6.3 durante la realización del trabajo de secuenciación. En una repetición de las muestras efectuadas en el laboratorio de la Dra. Margaret Kline del NIST pudo ser secuenciada de manera limpia solo una de las cinco muestras en estudio. La causa de este resultado no está claro, pues en las variantes 10.3 y 9.1, realizadas bajo las mismas condiciones tanto de reactivos, equipos y tiempo, que las 6.3, si se logró obtener secuencias claras de cada uno de los alelos.

El establecimiento de las variantes observadas en este trabajo permite la obtención de un mejor perfil de identificación de los individuos, pues se aumenta la diversidad de alelos para el marcador D7S820 que pasa de tener 10 alelos a 13 alelos posibles para el análisis

forense de la población costarricense hasta el momento y, en consecuencia, el uso de estos alelos fortalece el cálculo estadístico en las investigaciones de paternidad que se llevan a cabo en la Sección de Bioquímica del OIJ, y por ende la calidad y exactitud de los resultados que se obtienen.

## **5. Conclusiones**

1. Se logró establecer el protocolo necesario para realizar la determinación de las variantes alélicas 9.1 y 10.3 para el marcador D7S820, se consiguió de esta manera la confirmación y la descripción de la estructura de cada una de las variantes alélicas del marcador, por medio de la secuenciación. En el caso de la variante 6.3 se debe seguir mejorando el protocolo para lograr una secuenciación limpia. El establecer las variantes alélicas es de gran importancia, pues permite aumentar el número de alelos disponibles del marcador para la población costarricense y así poder obtener un mejor perfil de identificación para los individuos.
2. Se obtuvieron los pesos promedios en pares de bases en los sistemas AmpFISTR®Identifiler® y PowerPlex®16 para las variantes alélicas del marcador D7S820, lo cual es de gran utilidad para los analistas de las investigaciones de paternidades analizadas de rutina en la Sección de Bioquímica del Departamento de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, pues en el 2007, por ejemplo, el marcador D7S820 fue el segundo marcador que presentó más OL, mientras que el primero fue el marcador D18S51.
3. Se dispone ahora de un iniciador alternativo para el marcador D7S820, el cual permite amplificar y secuenciar las variantes de este marcador.
4. Asimismo, se estimó la frecuencia de las variantes alélicas en la población costarricense.
5. La única dificultad con que se topó fue la obtención de la estructura de la secuencia de la variante alélica 6.3.

6. Se muestra que la adición de variantes alélicas fortalece el cálculo estadístico de las investigaciones de paternidad.
7. Se recomienda seguir con el estudio de las variantes alélicas de los marcadores STR, tanto en su descripción y secuenciación, para así obtener mejores perfiles de identificación humana particularmente para la población costarricense.

## 6. REFERENCIAS

Aşıcıoğlu, F., F. Oguz-Savran y U. Ozbek. (2004) Mutation rate at commonly used forensic STR loci: Paternity testing experience. *Dis Markers*. 20: 313-5

Butler J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*. 2ª edición. Elsevier Academic Press. Londres, Inglaterra.

Butler, JM. y MC. Kline. (2005) Finding Point Mutations, Deletions and New Alleles Through STR Allele Sequencing. 4th Annual Bode East Coast Advanced DNA Technology Workshop. Disponible en: [www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm)

Butler J.M. (2006) Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing, *J. Forensic Sci*. 51: 253–265.

Butler, J. M. y D.J. Reeder. Short Tandem Repeat DNA Internet Database, <http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/index.htm>.

DNA recommendations (1994). Report concerning further recommendations of the DNA commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) system, *Foren. Sci. Int*. 69: 103–104.

Egyed, B., S. Furedi, M. Angyal, L. Boutrand, A. Vandenberghe, J. Woller y Z. Padar. (2000). Analysis of eight STR loci in two Hungarian populations. *Int J Legal Med* 113: 272–275.

Grubwieser, P., R. Mühlmann, H. Niederstätter, M. Pavlic y W. Parson. (2005) Unusual variant alleles in commonly used short tandem repeat loci. *Int J Legal Med*. 119: 164–166.

Jeffreys, A.J. y K. Tamakia. (2005) Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Med.* 7: 244–250.

Jobling, M.A. y P. Gill. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genetic.* 5: 739–51.

Lazaruk, K., J. Wallin, C. Holt, T. Nguyen y P. Walsh. (2001). Sequence variation in humans and other primates at six short tandem repeat loci used in forensic identity testing. *Forensic Sci Int* 119: 1-10.

Poyatos, D. y I. Morer. (2008) Pruebas de Paternidad. Manual Genética Molecular y Patologías Hereditarias. Barcelona, España.

Rocabado, O. (2004). Normalización de la toma de muestras para la investigación de la paternidad biológica a través del análisis de ADN. *Revista Médica España* 10: 20-26.

Ruitberg, C., D. Reeder y J. Butler. (2001). STRBase: a short tandem repeatDNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 29: 320–322.

Rozen, S. y H. Skaletsky. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Sobrino, B., M. Brión, A. Carracedo. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int* 154: 181-194.

Sozer, A.C., C.M. Kelly y D.B. Demers. (1997) Molecular Analysis of Paternity. In Dracopoli *et al.* (eds) *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley and Sons Inc. New York, USA.

The FBI DNA Laboratory: A Review of Protocol and Practice Vulnerabilities. (2004).  
Reporte de la Oficina del Inspector General, Departamento de Justicia de los Estados  
Unidos de América. <http://www.usdoj.gov/oig/special/0405/index.htm>.