



**UNIVERSIDAD
MICHUACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

**VALIDACIÓN INTERNA DEL KIT POWERPLEX® 16 HS PARA
LA TIPIFICACIÓN DE STRs POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

**TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

MARISOL MARTÍNEZ CORREA

ASESOR

M. C. GABINO ESTÉVEZ DELGADO

CO-ASESORA

M. C. VERÓNICA ESPINOZA GONZÁLEZ

Morelia Michoacán, Agosto 2011

REVISORES

M. EN F.B. ELISA LÓPEZ LOEZA.

D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO.

D.C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ.

Q.F.B. LILLIAN BRIBIESCA RODRÍGUEZ.

I. Q. JORGE PAVEL VICTORIA TAFOYA.

*Con mucho cariño para mis padres amados,
quienes me han otorgado los dos regalos más preciados que poseo...
la vida y mi carrera.*

*“¡Que pequeñas son mis manos en relación con todo
lo que la vida ha querido darme!”*

Ramón J. Sénder

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios por haberme permitido concluir con este proyecto porque gracias a Él pude lograrlo, además quiero agradecer a las instituciones que me dieron la oportunidad de hacerlo y a todas las personas que en algún momento me brindaron su apoyo moral y profesional para poder realizar la presente tesis. De manera especial a:

Principalmente les agradezco a mis padres René y Esmeralda porque sin su apoyo incondicional, la confianza y oportunidad que me dieron esto no hubiese sido posible. Este trabajo es para ustedes, con el finalizo esta etapa maravillosa de mi vida y en el reflejo todo el esfuerzo que hicieron por mí durante más de 5 años, hice lo mejor que pude y no me queda más que decirles: ¡Gracias por todo... los quiero!

Cristopher, gracias por los comentarios y aportaciones que hiciste a mi redacción, por apoyarme y por estar conmigo en estos momentos tan especiales de mi vida.

Les agradezco de manera muy especial a mis queridas hermanas Norma, Esmeralda y Yesenia porque contribuyeron para que pudiera venir a Morelia a estudiar, gracias por todo, las quiero mucho.

A mi amigo Francisco porque aunque no he tenido la oportunidad de conocerlo en persona, me ha apoyado demasiado a mí y a mi familia, gracias por la amistad de tantos años, te quiero mucho.

A mis queridas amigas Karen, Chely, Ana, Paty, Yuni y Ofé porque me apoyaron a lo largo de la carrera, gracias por su amistad incondicional, por todas las sonrisas, lágrimas y por todos los momentos inolvidables que vivimos, las quiero.

De manera muy especial a la Maestra Elisa López Loeza porque me dio la oportunidad de realizar mi tesis en esta área, que en particular me gusta mucho, gracias porque siempre recibí su apoyo.

A mi Maestro y asesor Gabino Estévez Delgado porque me brindo la oportunidad de formar parte de su grupo de tesis, le doy las gracias porque me ha apoyado incondicionalmente en la realización de la tesis además de contribuir en mi formación académica.

A mi Maestra y asesora Verónica Espinoza González porque con ella pase tardes enteras analizando y revisando los datos de las mediciones, le agradezco mucho su apoyo, colaboración y aportaciones que hizo a mi trabajo, además de su paciencia.

A mis revisores por el tiempo que dedicaron a la revisión de mi tesis, gracias por su apoyo, consejos y aportaciones que hicieron porque gracias a ello mejore en mi trabajo.

Al Laboratorio de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Michoacán porque me abrió las puertas para realizar este estudio.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la oportunidad de formar parte de ella y poder estudiar una carrera profesional.

Finalmente agradezco a la Facultad de Químico Farmacobiología por permitirme formarme como Químico Farmacobióloga.

RESUMEN

La validación de métodos es una necesidad que actualmente enfrentan laboratorios y empresas, ya que de ello depende no solo la calidad sino también la reproducibilidad de los resultados, lo que se traduce en beneficios para las empresas que brindan los servicios y que repercute en la satisfacción de los clientes; además es una herramienta indispensable para llevar a cabo la acreditación del laboratorio.

Existen guías en las que pueden apoyarse los laboratorios y de esta manera realizar la validación de un método, ejemplo de ellas es la guía europea EURACHEN, que contiene información sobre diferentes parámetros que pueden calcularse de acuerdo a las características del método empleado, también el FBI cuenta con guías en el área de Genética que son empleadas para la validación de kits utilizados para la amplificación y secuenciación del ADN en la determinación del perfil genético de las personas. El laboratorio de Genética Forense de la PGJE de Michoacán, realizó un estudio de validación interna con el objetivo de identificar los intervalos de trabajo más adecuados para realizar el análisis del ADN mediante un kit comercial, con la finalidad de trabajar de una manera más eficiente y con ello obtener mejores resultados en la obtención del perfil genético.

La técnica empleada para validación interna utilizando el kit PowerPlex[®] 16 HS y el control positivo de ADN 9947A, brindó información sobre las interferencias que se presentan al tipificar los STRs así como los parámetros de trabajo ideales. La validación del método fue tan relevante que en abril del 2011 contribuyó en la Acreditación del Laboratorio Forense de la PGJE ante la Entidad Mexicana de Acreditación, siendo el primer laboratorio en esta área que logra este prestigio en México y en América Latina.

Palabras clave: STR, ADN, control interno de ADN 9947A, validación interna, alelo, perfil genético, stutter, % de proporción, límite de detección, sensibilidad, rango dinámico, umbral estocástico, repetibilidad, reproducibilidad, calidad.

ÍNDICE
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Abreviaturas	11
1.1 Introducción	13
1.2 Planteamiento de la Hipótesis	15
1.3 Objetivos	15
1.3.1 Objetivo general	15
1.3.2 Objetivos específicos	16
1.4 Variables	16
1.4.1 Variables independientes	16
1.4.2 Variables dependientes	16
1.5 Delimitación del tema	17

CAPÍTULO II. TIPIFICACIÓN DE LOS STRs.

2.1 Revisión Bibliográfica	19
2.2 Marco referencial	20
2.2.1 ADN, la base de la herencia genética	21
2.2.2 STRs y el sistema de CODIS	26
2.2.3 Características del kit PowerPlex® 16 HS System	28
2.2.3.1 Características del control positivo de ADN 9947A	31
2.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), características generales	32
2.2.5 Electroforesis capilar (EC), características generales	35
2.2.6 Interferencias en la tipificación de los STRs	38
2.2.7 Validación de un método	40
2.2.7.1 Objetivo de validar	41
2.2.7.2 ¿Cuándo, cómo, porque y quién realiza la validación un método?	41
2.2.8 Técnicas de validación	42
2.2.9 Tipos de validación	43
2.2.10 Proceso de validación	46

2.2.11	Parámetros a evaluar en la validación interna del kit PowerPlex® 16 HS System	47
2.2.11.1	Análisis del umbral	47
2.2.11.2	Sensibilidad	48
2.2.11.3	Rango dinámico	48
2.2.11.4	Umbral estocástico	49
2.2.11.5	Precisión y reproducibilidad	50
2.3	Marco jurídico	51
2.3.1	Aspectos legales	52
2.3.2	Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006	53
2.4	Marco filosófico	54
2.4.1	Filosofía de la ciencia	55
2.4.2	Bioética	55
2.4.2.1	Criminalística y ética	56
2.5	Marco histórico	57
2.5.1	Inicio de la validación	58
2.5.2	Estudios relacionados con la tipificación de los STRs loci del ADN	58
2.5.2.1	Genética y Genómica la base de los loci Short Tandem Repeats utilizados en exámenes de identidad humana	58
2.5.2.2	Variación magnitud-dependencia en el balance de la altura de los picos de los STR heterocigotos	59
2.5.2.3	Análisis sistemático de los porcentajes de stutter, altura de los picos de los alelos y la relación de las áreas de los STR heterocigotos en casos forenses de trabajo y muestras de bases de datos	60
2.5.2.4	Validación del kit PowerPlex® 16 de Promega para las pruebas de paternidad	61

CAPITULO III. MÉTODO Y MATERIALES.

3.1	Procedimiento	64
3.2	Método	65
3.3	Material y equipo	66
3.4	Técnica	67
3.4.1	Preparación de las muestras	67
3.4.2	Análisis de las muestras empleadas para el estudio de validación	69

CAPITULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Resultados	71
4.2 Resultados obtenidos	72
4.2.1 Análisis del umbral	72
4.2.1.1 Cálculo del límite de detección	73
4.2.2 Sensibilidad	75
4.2.2.1 Perfil completo	75
4.2.2.2 Número de stutters observados	76
4.2.3 Rango dinámico	78
4.2.4 Umbral Estocástico	80
4.2.5 Precisión y Reproducibilidad	82
4.3 Discusión	90

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO.

5.1 Importancia de los resultados obtenidos	94
5.2 Conclusiones	95
5.3 Trabajo a futuro	96

GLOSARIO	97
-----------------------	----

REFERENCIAS	102
--------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS.
FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la doble hélice del ADN	23
Figura 2. Estructura del cromosoma 17 del humano	24
Figura 3. Ejemplo de un electroferograma	37
Figura 4. Ejemplo que muestra la aparición de los productos stutter	39
Figura 5. Procedimiento general para la preparación de las muestras	67

TABLAS.

Tabla 1. Tabla que muestra información general y características de los STRs del PowerPlex® 16 HS System	29
Tabla 2. Tabla que muestra los alelos que contiene el control positivo de ADN 9947 A	31
Tabla 3. Resultados de las medias obtenidas en las repeticiones para cada tiempo de inyección ...	72
Tabla 4. Desviaciones estándar obtenidas de los datos correspondientes a la Tabla 2	73
Tabla 5. Valor del LD para cada tiempo de inyección	74
Tabla 6. Porcentaje de alelos obtenidos para la concentración 0.5 ng	75
Tabla 7. Porcentaje de alelos obtenidos para la concentración 1.0 ng	75
Tabla 8. Número de stutter observados en la concentración de 0.5 ng	76
Tabla 9. Número de stutter observados en la concentración de 1.0 ng	77
Tabla 10. Medias de las alturas (RFU) de las repeticiones para los 16 marcadores del kit a las diferentes concentraciones	78
Tabla 11. Media de % proporción de los picos heterocigotos de las repeticiones calculadas en cada concentración para los 9 alelos heterocigotos	80
Tabla 12. Resultados obtenidos en la concentración de 0.05 ng, repetibilidad y reproducibilidad ..	82
Tabla 13. Resultados obtenidos en la concentración de 0.1 ng, repetibilidad y reproducibilidad ..	84
Tabla 14. Resultados obtenidos en la concentración de 0.25 ng, repetibilidad y reproducibilidad ..	86
Tabla 15. Resultados obtenidos en la concentración de 0.5 ng, repetibilidad y reproducibilidad ...	87
Tabla 16. Resultados obtenidos en la concentración de 1.0 ng, repetibilidad y reproducibilidad	88
Tabla 17. Resultados obtenidos en la concentración de 2.0 ng, repetibilidad y reproducibilidad	89

GRÁFICAS.

Gráfica 1. Gráfica que representa el LD para cada tiempo de inyección	74
Gráfica 2. Porcentaje de alelos presentes para cada concentración	76
Gráfica 3. Número de stutter observados para cada concentración	77
Gráfica 4. Rango Dinámico mostrando la altura de los picos (RFU) de los 16 marcadores correspondientes al kit	79
Gráfica 5. Porcentaje de proporción para los marcadores heterocigotos	81
Gráfica 6. Promedio de la medida de los alelos de las repeticiones en la concentración de 0.05 ng	83
Gráfica 7. Promedio de la medida de los alelos de las repeticiones en la concentración de 0.1 ng	85
Gráfica 8. Promedio de la medida de los alelos de las repeticiones en la concentración de 0.25 ng	86
Gráfica 9. Promedio de la medida de los alelos de las repeticiones en la concentración de 0.5 ng	87
Gráfica 10. Promedio de la medida de los alelos de las repeticiones en la concentración de 1.0 ng	88
Gráfica 11. Promedio de la medida de los alelos de las repeticiones en la concentración de 2.0 ng	89

ABREVIATURAS

PGJE. Procuraduría General de Justicia del Estado.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ARN. Ácido Ribonucleico.

A. Adenina.

G. Guanina.

T. Timina.

C. Citosina.

STR. Short tandem repeat. (Pequeñas repeticiones en tandem).

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

EC. Electroforesis capilar.

pb. Pares de bases.

Mb. Un millón de pares de bases.

FBI. Oficina Federal de Investigaciones (Federal Bureau of Investigation).

CODIS. Combined DNA Index System.

ng. Nanogramos.

RFU. Unidades de fluorescencia relativa (Relative fluorescence units)

LD. Límite de detección.

EURACHEN. Foro Europeo para discutir el Control de Calidad en Química Analítica.

ema. Entidad Mexicana de Acreditación.

CENAM. Centro Nacional de Metrología

ISO. Organización Internacional de Estandarización (International Organization for Standardization).

IUPAC. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry).

AOAC INTERNATIONAL. Asociación Científica dedicada a la Excelencia en Métodos Analíticos (The Scientific Association Dedicated to Excellence in Analytical Methods).

NOM. Norma Oficial Mexicana.

NMX. Norma Mexicana.

FDA. Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration).

ILAC. Laboratorio Internacional de Cooperación para la Acreditación (International Laboratory Accreditation Cooperation).

NCCLS. Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

*“No basta con alcanzar la sabiduría,
es necesario saber utilizarla”*

Marco Tulio Cicerón

1.1 INTRODUCCIÓN

El ser humano se ha caracterizado por su capacidad de socialización, ha vivido en grupos de personas con las cuales interactúa día a día, ha construido grandes ciudades y se ha preocupado por el desarrollo de la ciencia y la tecnología con la finalidad de tener una mejor calidad de vida y con ello asegurar el bienestar de su familia y de las personas que tienen una relación con él. Debido a que el ser humano vive interactuando con tanta gente, se ve envuelto en un sin número de problemas sociales a los cuales se enfrenta a diario, como lo son: violaciones, secuestros, desastres en masa que matan a miles de personas, extravío de familiares, etc., pero también existen algunos problemas que afectan su núcleo familiar, un ejemplo de esto es cuando se requiere comprobar la paternidad, la cual es importante para resolver problemas de herencias o de manutención, entre otros. Para solucionar estos problemas, a lo largo de la historia, se ha buscado la manera de identificar a las personas, y en ciertos casos, comprobar la paternidad recurriendo a la similitud de los rasgos físicos, color de piel y ojos, comparación de huellas dactilares, entre muchos otros métodos que no son confiables en su totalidad y que pueden llevarnos a resultados erróneos, además de que no siempre se puede recurrir a ellos.

A través de los años gracias a los conocimientos obtenidos en Biología se descubrieron los grupos sanguíneos, los cuales fueron utilizados para relacionar a las personas con sus familiares y descendientes. Posteriormente a mediados del siglo XIX apareció la Genética, que es una rama de la Biología cuyo objeto de estudio es la herencia y el ADN; Gregor Mendel, su principal precursor, observó que los organismos heredaban caracteres de manera diferenciada por medio de unidades básicas, que actualmente son denominadas genes [1]. La Genética ha experimentado importantes avances en biología molecular porque ha permitido demostrar la identidad biológica y el parentesco entre individuos de la misma especie a partir del análisis de ADN procedente de muestras biológicas obtenidas de hueso, sangre, cabellos, células epiteliales bucales, tejido epitelial, semen, dientes, etc. Sabemos que todos los seres humanos tienen moléculas de ADN en sus células y que contienen la información hereditaria; en la especie humana más del 90% del ADN es idéntico en todos los individuos y solo una pequeña parte difiere de una persona a otra, por ello para realizar la prueba genética de identificación es necesario aislar y amplificar solo las regiones variables denominadas STR; de esta manera, se genera el perfil genético de un individuo [2]. Para llevar a cabo este proceso es necesario analizar el ADN utilizando un método que nos permita amplificar estas regiones, esto se puede lograr mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y

electroforesis capilar (EC). Este método es muy utilizado en el área forense debido a la eficacia, eficiencia, prontitud y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Actualmente, la sociedad enfrenta con mayor frecuencia problemas en los que se requiere demostrar la identidad biológica de las personas involucradas en delitos, así como casos en los que se requiere comprobar la paternidad, es por ello que la Procuraduría General de Justicia en atención a esta necesidad, ha implementado la realización de la prueba pericial de identidad genética, la cual es una herramienta indispensable para resolver estos casos. Debido a la relevancia que tiene esta prueba, el presente estudio tiene la finalidad de realizar mediciones correspondientes a la amplificación y secuenciación del ADN para la *tipificación* de STR que se realiza en los laboratorios de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Michoacán mediante el kit PowerPlex[®] 16 HS System en PCR y electroforesis capilar, esto con el objetivo de realizar una validación interna del método y con ello garantizar que se trabaja de una manera eficiente y que los resultados obtenidos son confiables y de alta calidad.

1.2 PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Determinar la identidad genética es un problema de gran relevancia que actualmente nuestra sociedad enfrenta con mayor incidencia que en tiempos pasados. En respuesta a este problema social y con el avance que la ciencia y la tecnología nos ofrecen, se introdujo la prueba pericial de genética para determinar la identidad de las personas utilizando muestras de ADN.

Para llevar a cabo una aplicación adecuada de este método es necesario conocer las características específicas como la concentración de ADN necesaria, el número de ciclos del secuenciador, el tiempo de inyección, etc., para un mejor análisis de los STRs. En base a esto, se diseñó este estudio para hacer una validación interna de la *tipificación* de STRs utilizando el kit comercial PowerPlex® 16 HS con un control positivo de ADN y con ello observar el comportamiento que pueden presentar las muestras que se procesan mediante este equipo si se someten a diferentes condiciones. Con base a lo anterior, planteamos una hipótesis de trabajo:

“Es posible obtener mediante el estudio de validación intervalos de trabajo adecuados para realizar la tipificación de los STRs con el kit comercial PowerPlex® 16 HS mediante Electroforesis Capilar utilizando un control positivo de ADN”

1.3 OBJETIVOS

Los objetivos nos plantean de una manera más específica los alcances o limitaciones que tiene nuestro estudio de investigación, son de suma importancia para poder cumplir con la hipótesis planteada. Con la finalidad de que nuestra investigación sea desarrollada de una manera más adecuada, los clasificamos en objetivos generales y objetivos específicos.

1.3.1 Objetivo general.

Realizar la validación interna del kit PowerPlex® 16 HS System para la *tipificación* de STRs por electroforesis capilar utilizando un control positivo de ADN.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Cumplir con los puntos 2.1.4.1, 2.1.4.2 y 2.4.1.3 que establece la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 para llevar a cabo la validación de un método.
- Determinar la concentración de ADN con la que se obtiene un perfil completo y con menor número de interferencias.
- Determinar el número de ciclos del secuenciador con que se obtienen mejores resultados.

1.4 VARIABLES

La hipótesis planteada en el presente trabajo puede ser afectada por variables dependientes e independientes, las cuales son presentadas a continuación.

1.4.1 Variables dependientes.

- Concentración de ADN.
- Número de ciclos en el termociclador.
- Número de corridas del capilar.
- Altura de los picos.

1.4.2 Variables independientes.

- *Ruido* en el secuenciador.
- Calidad de la formamida.
- Técnico operador.

1.5 DELIMITACIÓN DEL TEMA

Las mediciones se realizaron en los Laboratorios de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Michoacán de Ocampo en el mes de Octubre de 2010 donde se analizaron los controles y estándares correspondientes al kit PowerPlex[®] 16 HS System para llevar a cabo la validación interna de este.

Este primer capítulo describió brevemente el estudio de investigación que se llevó a cabo, de igual forma muestra la importancia que tiene validar la prueba pericial en genética, porque no solo beneficia a las personas a las que se les realiza la prueba, sino que también es de utilidad para el laboratorio mismo ya que con la validación de sus métodos puede acreditarse ante la Entidad Mexicana de Acreditación (**ema**), como un laboratorio que ofrece resultados confiables.

En el siguiente capítulo se explica detalladamente cómo se lleva a cabo el proceso de validación interna, se mencionan las características generales del ADN y de todo lo relacionado con el tema tales como: la descripción del método utilizado, los trabajos ya realizados, aspectos jurídicos, etc., esto con la finalidad de comprender el estudio de validación que realizamos.

CAPÍTULO II

TIPIFICACIÓN DE LOS STRs.

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.
Ahora sabemos que está en nuestros genes”*

James Watson

2.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El presente capítulo tiene por objeto mostrar las bases teóricas que nos permiten comprender e interpretar adecuadamente el concepto de validación, se aborda de manera más específica los principios que dan origen al estudio en general para posteriormente, en el capítulo IV, llevar a cabo el análisis de los resultados.

La información se estructura en cuatro marcos los cuales son: referencial, filosófico, jurídico e histórico. Estos marcos nos dan un preámbulo para entender la forma en la cual se desarrolla el estudio de validación interna. En el marco referencial se describen los principios teóricos que giran en torno al proceso de validación así como las características generales del ADN, el marco jurídico menciona los requisitos de las normas mexicanas que deben de cumplirse para llevar a cabo la validación interna del método y, debido a que el tema está relacionado con cuestiones jurídicas, se mencionan códigos y leyes mexicanos que rigen el procedimiento de la prueba de paternidad mediante la obtención del perfil genético. El marco filosófico muestra los aspectos bioéticos que se relacionan con el área de las ciencias biológicas y criminalística. Finalmente, en el marco histórico se hace un análisis retrospectivo de algunas investigaciones relevantes que nos ayuda a destacar aspectos ponderantes de la validación interna de nuestro método.

2.2 MARCO REFERENCIAL

En este marco recopilamos toda la información pertinente alrededor de la temática plateada en nuestra investigación, comienza hablando sobre el ADN, características de este, tales como la región que nos interesa amplificar para realizar la prueba de identidad genética y la manera en que podemos hacerlo. Posteriormente mencionaremos las generalidades del control positivo de ADN empleado, así como PCR y Electroforesis Capilar. Todos estos recursos son necesarios para poder llegar al centro de nuestro estudio que es la validación interna del método.

En cuanto a la validación es necesario conocer la definición, así como los tipos de validación que existen, siendo necesario dar respuesta a preguntas tales como: ¿Cuál es el objetivo de validar?, ¿Porqué se validan los métodos?, ¿Quiénes llevan a cabo la validación?, ¿Cuál es el proceso a seguir?, entre otras dudas que se resuelven en este capítulo.

Una vez que se sabe todo respecto al tema es tiempo de describir los parámetros a calcular para la validación interna, como son el límite de detección, sensibilidad, umbral estocástico, destacándose entre los más importantes, pero detallando algunos que son de estudio relacionado en la temática de validación.

2.2.1 ADN, la base de la herencia genética.

Desde hace mucho tiempo se sabía que los descendientes no eran siempre idénticos a los padres, aunque generalmente se presentan rasgos similares que se comparten incluso entre hermanos. El mecanismo de la herencia que explica las semejanzas y diferencias entre los padres y su descendencia era desconocido, sin embargo, a lo largo de la historia abundaron teorías e ideas que trataban de dar una explicación a este fenómeno, fue así que durante la era Pre-Mendeliana aparecieron grandes investigadores que aportaron sus conocimientos y dieron origen a lo que hoy en día conocemos en Genética; cada estudio se llevó a cabo por separado pero todos con un mismo fin, que era conocer el origen de la herencia. [3]

Gregor Johann Mendel estaba interesado en observar la herencia de caracteres específicos, así que comenzó sus estudios en 1856 con guisantes de jardín, experimentó con ellos durante 8 años hasta llevarlos a la cuarta generación, anotando sus hallazgos con enorme cuidado y analizando sus resultados estadísticamente, de esta manera, en todos sus experimentos, fue capaz de determinar la paternidad de la descendencia. Mendel dedujo que los “factores”, que actualmente se conocen como *genes*, se segregaban unos de otros en diferentes *gametos*. Ahora se sabe que los genes son las unidades hereditarias que se transmiten de una generación a la siguiente, sin embargo, fue hasta 1944 que O. T. Avery, C. M. MacLeod y M. McCarty identificaron el ADN como material genético y Miescher fue el primero en aislar ADN del núcleo de una célula, pero no lo asoció con la herencia, sólo le dio un papel estructural. Griffith en 1928 fue quien dio la base para la identificación del ADN como material genético. Gracias a las aportaciones que hicieron estos investigadores, el ADN comenzó a estudiarse de una manera más detallada.[3]

La molécula ácido desoxirribonucleico comúnmente conocido como ADN se encuentra dentro de la célula, generalmente al interior del núcleo, aunque también existe una pequeña fracción fuera de él en un organelo llamado mitocondria (*mtADN*). Los organismos multicelulares, como el hombre, poseen un ADN idéntico en cada una de los millones de células que posee, no importa si se trata de células de sangre, hueso, diente, piel, semen, cabello mucosa oral o genital, etc. Por ser una molécula que nos acompaña desde la concepción y dado que contiene todas las instrucciones para el desarrollo del ser vivo, el ADN es muy estable. James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura del ADN en 1953, dicha estructura simula una escalera larga y estrecha formada por un material flexible, está enrollada alrededor de su eje y adopta la forma de una doble hélice [figura 1

(A)]. Cada molécula de ADN está constituida por muchas unidades menores denominadas nucleótidos, estos están formados a su vez por un azúcar, generalmente desoxirribosa, así como bases nitrogenadas y fosfatos que se encuentran alternados en la larga cadena. En cada caso, el enlace que une a un residuo individual de azúcar es el enlace 3', 5'-fosfodiéster, esto significa que un grupo fosfato se une con el átomo de carbono 3' del azúcar con el átomo de carbono 5' del azúcar vecino, para formar las hebras complementarias. Las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno en la larga cadena, una hebra va en dirección 5'→ 3' y la otra con dirección contraria 3'→ 5', esto es en relación a los enlaces que anteriormente se mencionaron, esto se ilustra en la Figura 1, además se observan las uniones que presentan los nucleótidos en la cadena. Las **bases nitrogenadas** de las que está formado el ADN son adenina, timina, guanina y citosina, generalmente sólo se designan por la letra inicial de su nombre así que, se conocen como **A, T, G** y **C**. Cuando queremos referirnos a una porción particular de ADN, se puede escribir: AATTGCCTTTTAAAAA, esta es una forma aceptable de hacerlo. Como se observa en la Figura 1 (B), cada escalón de la cadena de ADN consiste en una pareja de bases, la adenina siempre forma pareja con la timina y la citosina con la guanina, sólo existen estas dos combinaciones y las bases se emparejan invariablemente en la molécula de ADN. Esta característica de la estructura del ADN se conoce como empaquetamiento de bases complementarias [4-7].

Al observar un fragmento de una cadena de ADN con la secuencia AATTGCCTTTTAAAAA, la cadena complementaria de bases que le corresponde es TTAACGGAAAATTTTT, esto es lo mismo que se representa en la Figura 1. Como se mencionó en el capítulo I, gran parte de nuestro ADN es idéntico al de todos los individuos del mundo, sin embargo menos del 10 % de la estructura total varía de una persona a otra, la diferencia radica en el orden en que las bases complementarias están acomodadas a lo largo de la cadena como producto de la combinación del ADN de los gametos. [7]

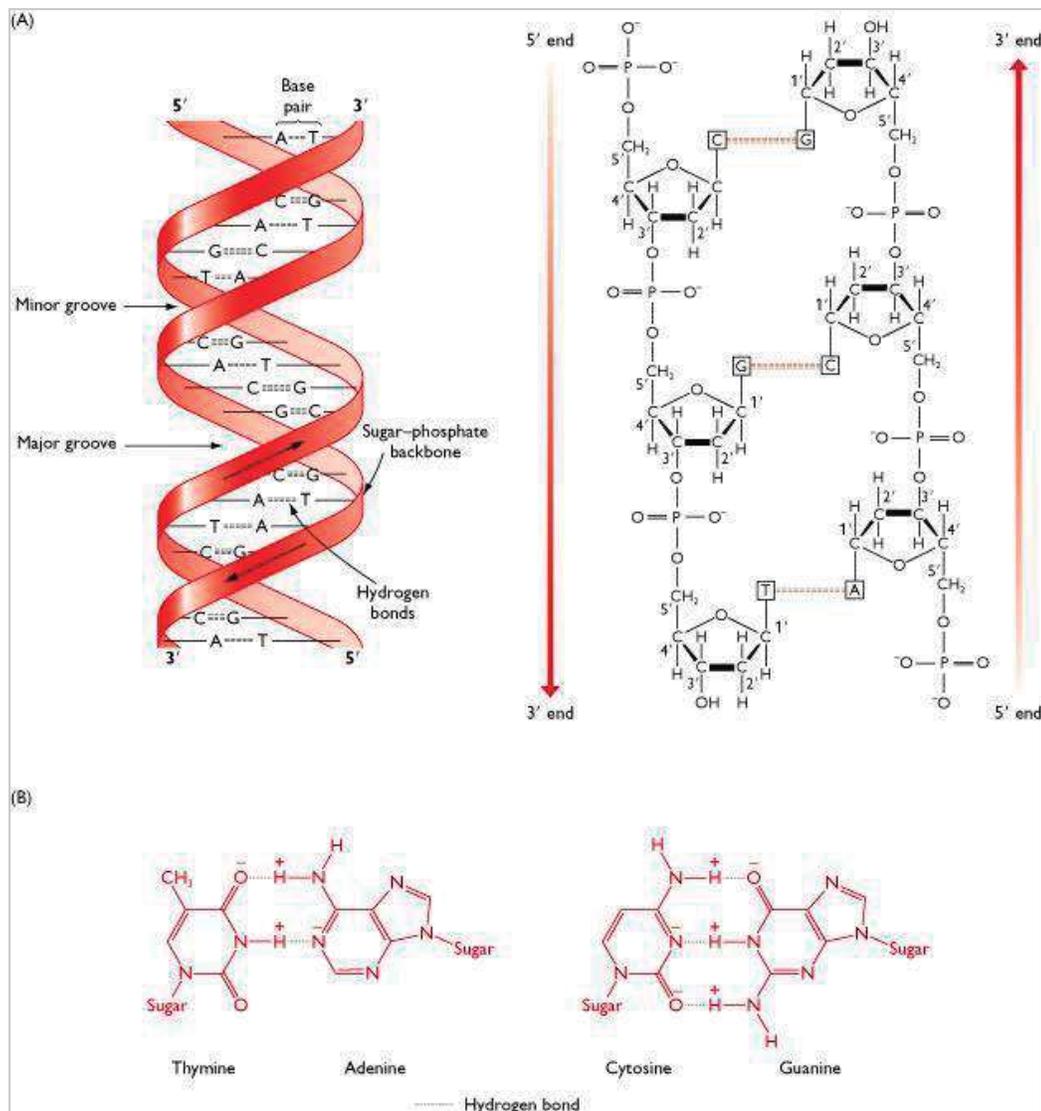


Figura 1. Estructura de la doble hélice del ADN. (A) Dos representaciones de la doble hélice. En la izquierda la estructura del azúcar-fosfato para cada polinucleótido se muestra en una cinta roja con los pares de bases en negro. En la derecha la estructura química para tres pares de bases. (B) Un par de bases de A con T y un par de bases de G con C. Las bases muestran un esquema con el puente de hidrógeno indicado con líneas punteadas. Nótese que G-C tiene tres puentes de hidrógeno mientras que A-T solo tiene dos. [8]

Los caracteres hereditarios se transmiten de una generación a la siguiente por medio de unas unidades hereditarias denominadas **genes**, estos se encuentran en la molécula de ADN en un segmento específico de pares de bases de la larga cadena ocupando un lugar en el **cromosoma**. Cada gen dirige la síntesis de una clase de molécula proteica que puede funcionar, por ejemplo, como una enzima, como un componente estructural de una célula o una hormona específica, etc. El ADN, en combinación con una matriz proteica, forma nucleoproteínas que se organizan en estructuras con propiedades tintoriales denominadas **cromosomas**, que se encuentran en el núcleo de las células, su estructura es más fácil de observar durante la profase tardía, metafase y anafase de

la división nuclear, cuando cada uno de ellos está sumamente enrollado. Cada uno de los progenitores aporta 23 cromosomas, 22 *autosomas* y uno sexual, por lo tanto la mitad de la carga genética es aportada por la madre y la otra mitad por el padre. Cuando se unen las células sexuales en la fecundación, el ADN que proviene de ambos padres se fusiona y comienza la formación de un nuevo ser con un juego de 46 cromosomas; mediante un proceso de división celular denominado mitosis, todas las células humanas se reproducen de esta manera. La “información genética” contenida en las moléculas de ADN determinan la transmisión de rasgos hereditarios, como el color de los ojos y piel, el grupo sanguíneo, características físicas, etc., de los padres a los hijos [6, 9].

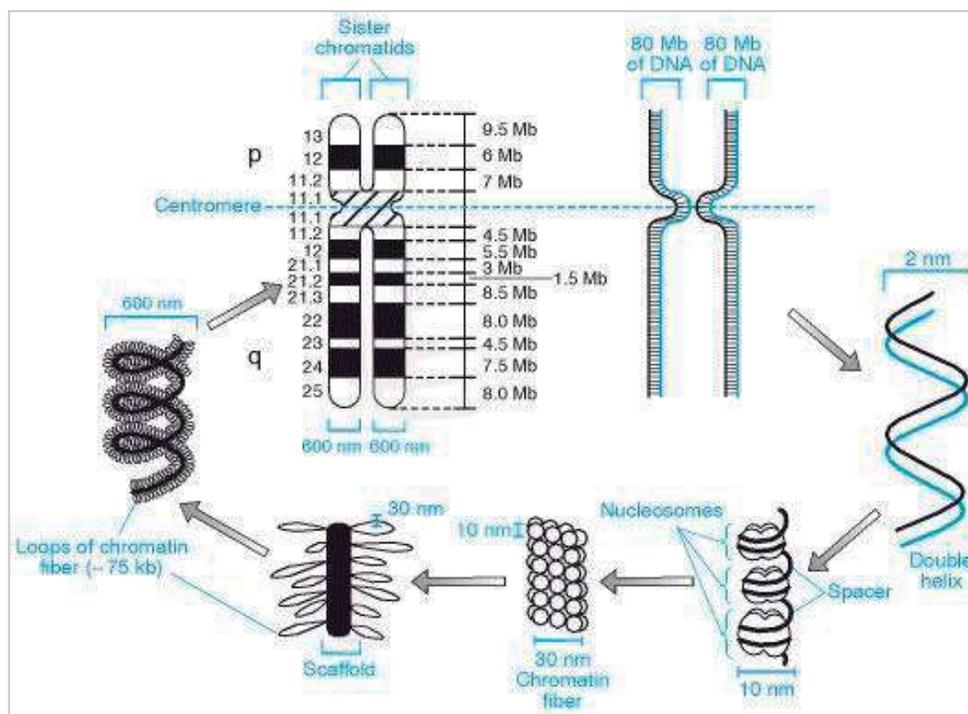


Figura 2. Estructura del cromosoma 17 del humano. Se observa como el ADN se agrupa hasta formar el cromosoma. [5]

Aunque los pares de bases del ADN son los mismos en los cromosomas de todos los individuos, estos difieren tanto en orden como en *secuencia*, este hecho tiene una enorme importancia funcional, puesto que la secuencia de cada gen en cada cromosoma es la que determina la herencia. La *secuencia* única determina el acomodo específico necesario para formar una proteína particular. Este almacén de información que existe en cada *gen* se denomina *código genético*. Los humanos poseemos 46 cromosomas en cada célula de nuestro cuerpo y el ADN nuclear representa un paquete de información genética total de aproximadamente 3 billones de pares de bases en unos 25,000 genes que codifican proteínas. Esto indica que cada progenitor, el

padre y la madre, aportan más de mil millones de fragmentos de información genética en los 23 cromosomas que heredan a sus descendientes, por lo tanto, dada la enorme cantidad de información genética contenida en nuestras células, es prácticamente imposible que una persona herede exactamente los mismos rasgos que otra [6-7].

Para llevar a cabo la identificación de una persona es necesario analizar partes específicas de los cromosomas para, esta manera, obtener su perfil genético. Debido a que tenemos una infinidad de regiones variables en el cromosoma, se ha optado por elegir sólo unas cuantas partes de éste para facilitar el estudio. En Genética, al lugar físico específico que un *gen* ocupa dentro de un *cromosoma* se denomina *locus*, a la unión de varios *locus* se le llama *loci*, que es el plural; siendo estos los segmentos de ADN que serán sometidos a análisis para identificar a una persona. Estos *loci* tienen nombres específicos como D5S818 o D21S11, otros nombres suelen ser aún más complejos como F13A01, CSF1PO o TPOX. La interpretación de la nomenclatura es sencilla por ejemplo, D5S818 significa que es un *locus* de ADN (DNA en inglés), localizado en el cromosoma 5, que es de cadena sencilla; la letra S, que también viene del inglés “Single Strand” y 818 es un número asignado en el banco genético mundial, *GenBank*[®], para determinar la posición que ocupa en el cromosoma. En cuanto a TPOX se refiere a una región próxima al gen de la tirosina peroxidasa, cuyo *locus* se encuentra en el cromosoma 2. Así F13A01 por su parte, se refiere a una región cercana a la sub-unidad A1 del gen del Factor 13 de la coagulación, sub-unidad 1, cuyo *locus* está en el cromosoma 6. Existen distintas variantes o alternativas en las secuencias de nucleótidos que pueden presentar los genes en cada locus, estas variantes se denominan *alelos* y un *locus* determinado puede tener uno o más *alelos*; la identificación humana y las pruebas de *filiación* se basan en el análisis de estas secuencias. Ahora bien, el *genotipo* es la combinación única de alelos que para cada locus presenta una persona; cuando se estudia el genotipo de un individuo se obtiene información exclusiva de esa persona. Es importante mencionar que para un locus determinado, los alelos aportados por los progenitores pueden ser iguales o diferentes. Cuando un individuo posee dos alelos diferentes en un locus determinado se denomina *heterocigoto*, a la inversa, cuando un individuo posee dos alelos iguales en un locus determinado se denomina *homocigoto*, esto se ve reflejado al obtenerse la lectura del perfil genético. [10-11]

Las variantes en la secuencia de ADN que se presentan de una persona a otra se encuentran en los alelos, este término se relaciona con el *polimorfismo* genético, del griego *poli* -muchos- y *morfos* -forma- y se refiere a la variación genética observada en las poblaciones, está relacionado con el número de *alelos* que hay en un *locus*, es decir, polimorfismo es el grado de variación que presenta cada locus, entre más alelos presentes hay mayor polimorfismo y, por lo tanto, mayor utilidad en identificación humana. [12]

2.2.2 STRs y el sistema de CODIS.

Como se mencionó anteriormente, los polimorfismos encontrados en las secuencias de ADN son los que diferencian a un individuo de otro, esto es de gran utilidad en los casos forenses en los que se requiere demostrar la paternidad o la identidad genética de las personas.

Para llevar a cabo el análisis de ADN nuclear, es importante el repetido en tándem minisatélite y microsatélite conocidos como *STRs* o “Short Tandem Repeats”, que son pequeñas repeticiones en tandem localizadas en *loci* específicos en los cromosomas. La unidad de repetición en los minisatélites es de 20 pares de bases, estos son en ocasiones muy polimórficos y los microsatélites son de menor longitud, pues sólo tienen de 3-7 pares de bases. Los STRs se repiten varias veces en una secuencia de ADN de diferente manera y número para cada persona, por ejemplo el STR “CAT” se repite tres veces en un individuo, pero cuatro veces en otro: CATCATCAT vs CATCATCATCAT, estos *polimorfismo* en combinación con otros STRs ayudan a identificar a las personas. Los STR que se utilizan principalmente son las repeticiones de tetranucleótidos, ya que los STR de dos nucleótidos, aunque son muy frecuentes y fáciles de amplificar, plantean problemas como la presencia de bandas tartamudas, *stutter* o tartamudeos, de las que se hablará más adelante, producidos por disminución o “*slipped-strand*” en la amplificación, que hace que su uso con fines forenses no sea considerado apropiado. Los STRs por sí solos no pueden dar un perfil de ADN porque carece de contexto, para propósitos de identidad se analiza mediante la comparación con una muestra de referencia denominada escalera alélica o *allelic ladder* que contienen una serie de *marcadores* que se comparan con las muestras de las personas sometidas a estudio. [13-14]

La Oficina Federal de Investigaciones de los Estados Unidos de América conocido como FBI, ha sido un líder en el desarrollo de tecnología de *tipificación del ADN* para su uso en la identificación humana mediante la obtención del perfil genético. En 1997 el FBI dio a conocer la selección de 13 STRs *loci* para constituir el núcleo central de la base de datos nacional de los Estados Unidos, este sistema se denomina CODIS (Combined DNA Index System), es un programa de apoyo a las bases de datos de ADN de la justicia penal que combina la tecnología de las computadoras con la tipificación del ADN mediante un software que permite la ejecución y entrada de las bases de datos que conforman los 13 STRs loci, de esta manera, los perfiles de ADN obtenidos son ingresados al sistema y así pueden ser comparados con otros para resolver casos de identificación. Todos los STRs loci del CODIS son secuencias repetidas de tetrámeros altamente específicos, con los que se puede identificar a una persona haciendo uso de sólo 10 de los 13 elegidos. El sistema de los 13 alelos STRs está formado por: CSF1PO, FGA, THO1, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, también son conocidos como *marcadores* de STRs. Además de dar a conocer los marcadores oficiales para la identificación del ADN, en 2010 el FBI aprobó el uso de diferentes *Expert System* que son programas de software especiales que interpretan los datos generados del análisis de ADN con cuales se generan los perfiles genéticos, además aprobó el uso de kits comerciales utilizados en PCR que facilitan la tipificación de los STRs de una manera eficiente, entre los cuales está el kit PowerPlex® 16 HS System. [15]

Cuando se utiliza el sistema de STRs de CODIS contamos con muchas ventajas tales como:
[13]

- Los perfiles STR se pueden determinar a partir de cantidades muy pequeñas de ADN.
- El sistema CODIS ha sido adoptado por numerosos analistas de ADN forense en las pruebas de paternidad e identificación de individuos.
- Los alelos STR se pueden determinar con rapidez empleando ensayos comerciales, que son conocidos como *kits*.

Desde que se dio a conocer el sistema CODIS hace más de diez años, varias empresas relacionadas con la tipificación del ADN han creado una serie de kits con los cuales se pueden analizar los STRs. Los científicos de estas empresas han descubierto nuevos loci altamente polimórficos los cuales han sido aumentados en los kits para que junto con los 13 STRs del CODIS aumenten el poder de identificación humana. [16]

Para poder analizar los *marcadores* de los STRs del sistema CODIS es necesario someter las muestras a un proceso específico que nos permita estudiar el ADN a detalle, este proceso es interesante y riguroso, dura alrededor de 3-4 horas por muestra; en general, los pasos que se llevan a cabo son: [17]

1. Toma de muestras y etiquetado.
2. Extracción del ADN.
3. Cuantificación del ADN.
4. Amplificación de los STRs mediante PCR utilizando kits.
5. Secuenciación de los STRs mediante electroforesis.
6. Interpretación de los resultados.

2.2.3 Características del kit PowerPlex® 16 HS System.[18-19]

El genoma humano puede ser fácilmente identificado haciendo uso de los STRs del sistema CODIS utilizando PCR. Los alelos de los STRs loci se diferencian por la secuencia de repetición dentro de la región amplificada y se distinguen unas de otras mediante la detección radioactiva, tinción de plata o de fluorescencia después de la separación electroforética. Este kit es un producto de Promega Corporation que permite la co-amplificación y la detección, en tres colores de dieciséis loci, quince STRs loci y la Amelogenina o AMEL. Este Kit es sometido a una validación total por parte de la empresa, posterior a ello, es distribuido en el mercado, sin embargo resulta de suma importancia que cada Laboratorio realice su propia validación interna para asegurar la calidad de los ensayos y establecer los parámetros más óptimos.

Los loci utilizados por el kit son: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, AMEL, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 y D5S818. El kit contiene un *primer* para cada uno de los loci, este es una pequeña cadena de polinucleótido, usualmente de 18-30 pb, que se dirige a una región específica de un templado de ADN y permite que la ADN polimerasa inicie la síntesis de la cadena complementaria. El Penta E, D18S51, D21S11, TH01 y D3S1358 tienen un primer etiquetado con fluoresceína o FL que genera un color azul, un *primer* para cada uno de los FGA D8S1179, TPOX, vWA y AMEL están etiquetados con carboxitetrametilrodamina o TMR, de color verde y finalmente un *primer* para cada uno de los D16S539 Penta D, CSF1PO, D7S820, D13S317 y D5S818 se etiqueta con carboxi-6-4 ', 5'-dicloro-

2', 7'-dimetoxi-fluoresceína o JOE, de color negro. En la Tabla 1 se describen de manera general las características de cada uno de estos marcadores.

Tabla 1. Tabla que muestra información general y características de los STR del PowerPlex® 16 HS System.

STR Locus	Etiqueta	Localización en el cromosoma	Definición de GenBank® Locus	Secuencia repetida 5'→3'
Penta E	FL	15q	No Aplica	AAAGA
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA (24)
D21S11	FL	21q11-21q21	HUMD21LOC	TCTA Complejo (24)
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, gen humano de la tirosina hidroxilasa	AATG (24)
D3S1358	FL	3p	No Aplica	TCTA Complejo
FGA	TMR	4q28	HUMFIBRA, gen humano del fibrinógeno de la cadena alfa	TTTC Complejo (24)
TPOX	TMR	2p24-2pter	HUMTPOX, gen humano de la tirosina peroxidasa	AATG
D8S1179	TMR	8q	No Aplica	TCTA Complejo (24)
vVW	TMR	12p12-pter	HUMVWFA31, gen humano del factor de von Willebrand	TCTA Complejo (24)
Amelogenina	TMR	Xp22.1-22.3 y Y	HUMAMEL, gen humano del cromosoma Y para la proteína Amelogenina	No Aplica
Penta D	JOE	21q	No Aplica	AAAGA
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	HUMCSF1PO, gen humano del c-fms proto-oncogen para el receptor CSF-1	AGAT
D16S539	JOE	16q24-qter	No Aplica	GATA
D7S820	JOE	7q11.21-22	No Aplica	GATA
D13S317	JOE	13q22-q31	No Aplica	TATC
D5S818	JOE	5q23.3-32	No Aplica	AGAT

Los productos de amplificación generados con Promega son de longitudes discretas y separadas, esto permite la construcción de escaleras alélicas conocidas como *allelic ladders* estándar con el cual son comparados los STRs para obtener el genotipo de una muestra porque contienen fragmentos de la misma longitud de varios o todos los alelos conocidos para cada locus del sistema CODIS de la población humana. La comparación visual o mediante un software entre la

escalera alélica y las muestras amplificadas para el mismo locus, permite la asignación rápida y precisa de alelos. Los resultados obtenidos mediante el kit se pueden grabar en un formato digital, permitiendo la comparación directa con las bases de datos almacenadas.

El kit incluye un estándar de medidas de los alelos, el ILS 600 (Internal Line Size), cada fragmento es etiquetado con carboxi-X- rodamina (CXR) de coloración roja y se utiliza para incrementar la precisión al asignar las medidas o sizes de los fragmentos de ADN separados en la electroforesis. Consiste en 22 fragmentos de ADN con un rango en la medida o size de 60-600 pb. La medida de los fragmentos de 60-200 pb son espaciados en intervalos de 20 pb, mientras que los fragmentos de 200-500 pb y 500-600 pb son espaciados cada 25 y 50 bases, es decir: 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 y 600.

El sistema amplifica todos los loci del CODIS en una sola reacción, también contiene dos pentanucleótidos repetidos en loci altamente polimórficos, el Penta E y Penta D. Estos *loci* adicionales aumentan considerablemente el poder de discriminación del sistema para resolver, definitivamente, disputas de paternidad y mezclas de ADN; se han estudiado varios tipos de razas de individuos y el poder de exclusión para la prueba de paternidad de este sistema excede el 0.999998 en todas las poblaciones sometidas a estudio. Además el nivel extremadamente bajo de stutter visto con Penta E y Penta D hace ideales los loci para evaluar mezclas de ADN que a menudo se encuentran en casos forenses. Finalmente, el locus de Amelogenina o AMEL, este no es un STR pero es de gran utilidad ya que muestra una banda específica en la base-106 en el cromosoma X y una en la base-112 del cromosoma Y, está incluido en el sistema para permitir la identificación del sexo de cada muestra. Dado que las mujeres son XX se muestra solo un pico en el electroferograma y en el hombre se muestran dos picos ya que es XY, la proporción de la altura de los picos de X y Y pueden ser útiles para determinar las mezclas de ADN en las que interviene un hombre y una mujer, tales como las violaciones.

Todos los loci se amplifican de manera simultánea en una reacción y se analizan en una sola inyección brindando óptimas condiciones de trabajo en un periodo muy corto de tiempo, debido a todas las características que brinda el PowerPlex[®] 16 HS, y por las ventajas con las que cuenta, el FBI lo aprobó para su uso en los laboratorios de Genética.

2.2.3.1 Características del control positivo de ADN 9947A.

El kit PowerPlex® 16 HS System además de la escalera alélica y el ILS 600 utiliza un *control positivo de ADN*. El templado de ADN 9947A fue obtenido por Life Technologies Inc., lo extrajeron de la línea celular linfoide humana del virus inmortalizado Epstein-Barr, es ADN nuclear y es usado en PCR basado en un perfil de ADN estándar designado para casos forenses y pruebas de paternidad, aplicación de la ley e investigación. Estas muestras de ADN provienen de cultivos de líneas celulares desarrollados a partir de personas aparentemente normales. Se utiliza como control positivo en los trabajos de rutina para confirmar que se obtiene el perfil correcto de STRs; se trabaja de manera similar a las muestras que son sometidas al proceso de amplificación y secuenciación. La Tabla 2., muestra los loci que contiene para cada marcador de STR, se observa que contiene 9 STRs heterocigotos, que son diferentes, 6 STRs homocigotos iguales y la Amelogenina en el cromosoma X. [18-21]

Este control se utilizó para realizar nuestro estudio de validación en los laboratorios de Genética Forense de la PGJE.

Tabla 2. Tabla que muestra los alelos que contiene el control positivo de ADN 9947 A.

STR Locus	Alelo de ADN que contiene
Penta E	12,13
D18S51	15,19
D21S11	30,30
TH01	8,9,3
D3S1358	14,15
FGA	23,24
TPOX	8,8
D8S1179	13,13
vVW	17,18
Amelogenina	X,X
Penta D	12,12
CSF1PO	10,12
D16S539	11,12
D7S820	10,11
D13S317	11,11
D5S818	11,11

2.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa, características generales.

El estudio del ADN ha experimentado un gran avance en los últimos años ya que se han desarrollado muchas herramientas para su análisis gracias a la tecnología con la que actualmente contamos, entre estas nuevas herramientas se encuentran: los métodos de amplificación de los ácidos nucleicos, la automatización de los métodos de genotipificación de marcadores genéticos y secuenciación de ADN. Kary B. Mullis en 1983 diseñó un método de amplificación de ADN *in vitro* basándose en lo que la célula emplea *in vivo*, esta técnica es conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR y desde que se comenzó a usar para el análisis del ADN, se han transformado totalmente los métodos de aislamiento y amplificación de éste. Hoy en día es considerada como una herramienta imprescindible para el análisis del ADN en los laboratorios de Biología Molecular, Genética, Ingeniería Genética y laboratorios Forenses; para esta última área se han realizado estudios que demuestran que dicha técnica es altamente robusta y reproducible con la que se obtienen perfiles completos de ADN. Actualmente contamos con tecnología cada vez mayor y la PCR convencional creada por Mullis fue modificada para obtener una cuantificación de ADN, de esta manera ahora existen dos tipos de PCR, que son: [22-23]

- **PCR convencional [24-26]:**

Este tipo de PCR se utiliza para el análisis cualitativo del ADN, el objetivo principal de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirectamente de un ARN, en este caso, a través de su ADN complementario o cADN, presentes en mezclas de muy diversas fuentes, como muestras de tejido, sangre, hueso, semen, saliva, pelo, etc. Se usa para la obtención de múltiples copias *in vitro* de una secuencia específica de ADN.

En los laboratorios de Genética Forense de la PGJE se utiliza PCR convencional para la amplificación del ADN, es por ello que sólo se mencionan a detalle las características de esta técnica.

Aplicaciones de PCR.

Las aplicaciones de la PCR son muy diversas y variadas, las más comunes son: clonación celular de fragmentos de ADN, detección de secuencias sin purificación previa, rastreo de mutaciones, tipado de ADN para transplantes, diagnóstico de enfermedades genéticas prenatales,

detección rápida de bajas cantidades de microorganismos y virus, mapeo de genes, determinación de secuencias específicas de ADN relacionadas con situaciones patológicas definidas, estudios evolutivos, detección de microorganismos infecciosos, detección de células tumorales, amplificación de ADN para su posterior clonación, resolución de problemas forenses o arqueológicos, secuenciación de ácidos nucleicos, establecimiento de polimorfismos de secuencia, entre otros.

Principio del método

La PCR está diseñada para producir una amplificación selectiva, de aprox. 10^6 veces de las secuencias específicas de ADN, lo que facilita su posterior manipulación y secuenciación. En general, consta de tres pasos:

1. **Desnaturalización** del ADN para dar hebras sencillas. La muestra se somete a calentamiento para que las dos hebras del ADN se separen, mediante una incubación breve de 30-120 segundos a una temperatura de entre 68 y 97° C, que debe ser superior a la de fusión de la región de DNA que se quiere amplificar.
2. **Hibridación** específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido o *primer*, esta etapa también se conoce como etapa de templado, porque se entiende que hay una disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica; aquí radica la importancia de conocer parte de la secuencia que se desea amplificar. Se lleva a cabo un enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión de la región que se quiere amplificar, de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas del DNA de interés con los primers. Generalmente se utilizan temperaturas de 37 a 65° C que se mantienen entre 10 y 120 segundos.
3. **Replicación** de la hebra sencilla por una ADN polimerasa a partir del *primer* anterior como cebador, también se conoce como elongación o extensión del cebador, o polimerización. Es la etapa de amplificación propiamente dicha, la muestra se somete a 72-75 °C, de 1 a 3 min, es en esta parte donde la ADN polimerasa termoestable *elonga* los *primers*, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación ocurre en dirección 5'→ 3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización, o siguiente ciclo.

Mediante la aplicación en forma cíclica de estos tres pasos se obtienen múltiples copias del fragmento de ácido nucleico en un corto periodo de tiempo. Se requiere de una sucesión de ciclos, generalmente entre 20 y 40 de 1.5 a 5 minutos de duración cada uno, para conseguir una enorme amplificación del número de moléculas que contienen la secuencia de interés o diana.

Todo este proceso se lleva a cabo en un equipo especial denominado *termociclador* y como su nombre lo indica, es el equipo en el que se llevan a cabo los ciclos térmicos de la PCR. Es un instrumento que permite realizar las copias de los STRs del ADN que son de interés, después de un número de treinta o cuarenta ciclos se obtienen millones de copias a partir de la muestra original. En general consiste de un bloque incubador que permite programar y regular variadas temperaturas y tiempos para cada uno de los ciclos de la PCR y durante todo el proceso.

Características del método

A continuación se mencionan las principales características con las que cuenta este método y de acuerdo a ellas podemos notar que al utilizar PCR en el análisis de ADN contamos con ventajas que no podríamos lograr con otros métodos.

- **Rendimiento:** en la práctica el rendimiento de cada etapa no es completo, a pesar de eso, es el método de elección para el análisis del ADN.
- **Duración:** la duración de cada una de las tres etapas de cada ciclo y el número de ciclos deben optimizarse dependiendo de la secuencia concreta que se quiera amplificar.
- **Especificidad:** es muy elevada, se puede determinar la especificidad analizando por electroforesis los productos generados.
- **Capacidad de detección:** capacidad de detección es muy alta ya que la PCR puede permitir detectar una única molécula de ADN en casi cualquier tipo de muestra clínica, forense o arqueológica. Sin embargo, esta característica supone un elevado riesgo de contaminación por, moléculas de origen ajeno a la muestra.
- **Fidelidad:** es la capacidad de copiar secuencias con precisión, sin introducir mutaciones.

- **PCR en tiempo real.**

A diferencia de la PCR convencional permite monitorear el transcurso completo de la reacción de PCR mediante la lectura de la fluorescencia emitida durante la reacción. Los resultados en PCR a tiempo real pueden ser analizados de forma cualitativa o de forma cuantitativa, que la detección de fluorescencia indica la presencia del fragmento buscado y el ADN se puede cuantificar de una manera precisa. Esta técnica ofrece una gran variedad de aplicaciones al ser capaz de cuantificar de manera absoluta o relativa moléculas de ADN o ARN. [21]

Una vez que las muestras de ADN son amplificadas, los alelos de los STRs *loci* son diferenciados por medio de fluorescencia y después sometidos a electroforesis capilar para su separación y *tipificación*. Esta es la etapa final del proceso en el cual se obtiene el perfil genético de las personas y es de utilidad para realizar las pruebas de identidad genética, prueba de paternidad, hermandad, etc.

2.2.5 Electroforesis capilar (EC), características generales.

Después de que las muestras son amplificadas, los productos son sometidos a electroforesis capilar (EC) o electroforesis en gel dependiendo del equipo que se tenga en el laboratorio. La ventaja de usar electroforesis capilar en lugar de electroforesis en gel es que hay una mejor separación de las moléculas de ADN.

Se sabe que todas las moléculas químicas son de diferente tamaño de acuerdo con los elementos que las conforman, de esta manera, si esas moléculas de tamaño diverso las sometemos a un campo eléctrico, van a migrar sobre una superficie y se van a separar, siendo las más pesadas las que migran lentamente y recorren menos distancia. En este proceso se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar moléculas de ADN o ARN (Ácido Ribonucleico) que fueron amplificadas mediante PCR, a un medio semisólido, generalmente un polímero de agarosa o acrilamida que actúa como filtro, restringiendo el paso de las moléculas en función de su tamaño. De esta manera podemos separar con precisión cada uno de los alelos que posee cada STR. [10, 20]

Aplicaciones de EC.

El principal campo de aplicación es la separación, identificación y -a veces- cuantificación de macromoléculas biológicas, especialmente en proteínas y herbicidas, marcadores tumorales, drogas de abuso, quiralidad de los compuestos activos, entre otros. La electroforesis en gel de poliacrilamida-urea es el método más común y eficaz para separar moléculas de ADN o ARN en función de su tamaño. También se ha aplicado a especies bioquímicas más simples, y en menor grado a especies inorgánicas. En química clínica su uso es muy frecuente en lipidograma y proteinograma. [27]

Principio del método.

En general el proceso consiste en inyectar, en un capilar muy fino de aprox. 50 μm de diámetro, los fragmentos de ADN que se amplificaron en PCR para que sean separadas de acuerdo a su tamaño. El capilar está recubierto por un polímero de POP-4 o de PO-6, generalmente el polímero de POP-4 es el que se utiliza en el análisis de los STRs, ambos contienen urea, la cual ayuda a que los fragmentos de ADN migren en una sola fila, estos fragmentos deben atravesar toda la longitud del capilar desde el punto de inyección hasta el punto opuesto al final del capilar. El voltaje utilizado en la electroforesis capilar es muy alto, 300V/cm, comparado con la electroforesis en gel, que es de 10V/cm. Este voltaje provoca que los fragmentos de ADN migren rápidamente y se separen a lo largo del polímero conductor con dirección hacia el ánodo, que es el polo positivo; cabe mencionar que un capilar más largo ofrece una mejor resolución. Al momento que las moléculas se van separando, un laser de Argón excita el *fluorocromo* y una cámara recolecta los datos en crudo para posteriormente ser coloreados por el espectro durante el análisis de los fragmentos de ADN. Cada fragmento se muestra impreso representado como un pico, en un *electroferograma*, que es un gráfico realizado con los resultados de un análisis por electroforesis mediante un software especial. Como se observa en el ejemplo de la Figura 3., la altura del pico, eje de las y, refleja la intensidad de la fluorescencia emitida y se representa en Unidades de Fluorescencia Relativa, conocidas como *RFU*, que representa la cantidad de ADN amplificado que se había inyectado. El eje de las x del electroferograma indica el tiempo que tardó el fragmento de ADN en cruzar el punto de detección, esto refleja el tamaño del fragmento. [28]

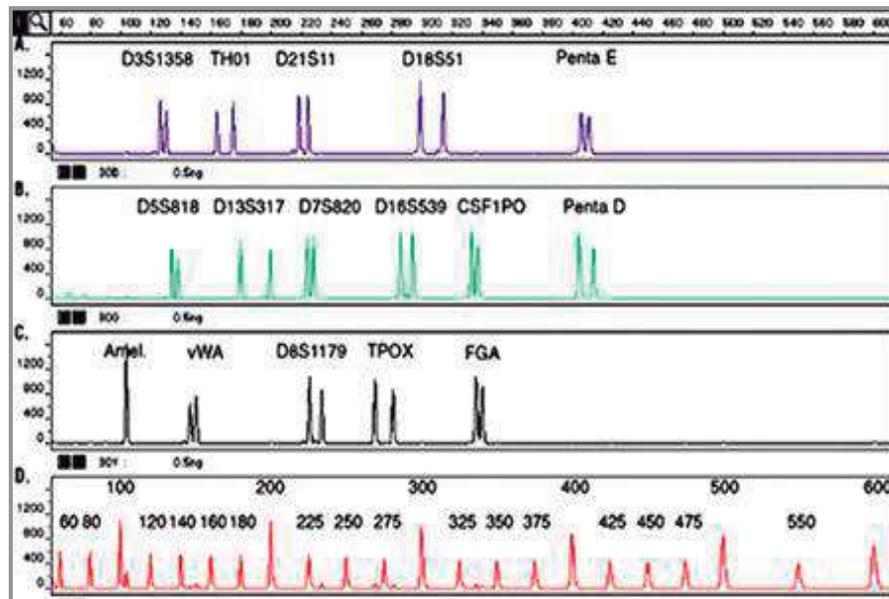


Figura 3. Ejemplo de un electroferograma en el que se ilustra la altura de los picos en RFU, mostrando los fragmentos de 60 pb a 500 pb el estándar ILS 600. (D). [29]

Esta etapa final se lleva a cabo en un equipo denominado *secuenciador*, secuenciar el ADN significa identificar el orden exacto en que las bases del ADN, A, G, C y T, se suceden en los STRs. Este equipo combina el método de la electroforesis capilar para separar los fragmentos de ADN con la tecnología de los tintes fluorescentes para marcarlos y posteriormente detectarlos en el *electroferograma*. Se inicia una reacción de secuenciación con los cuatro nucleótidos responsables de la terminación de la cadena; después, se incorpora un marcador fluorescente a cada base, la cual, emite una longitud de onda distinta para cada una de ellas, de manera que cada uno de los cuatro terminadores de la cadena presenta un color distinto; por ejemplo, uno de color azul para la terminación en A y uno que emita luz de color rojo para terminación en C; como ya se mencionó antes, el kit utilizado contiene tintes fluorescentes específicos para cada primer. Las bandas de ADN separadas se detectan gracias a su fluorescencia a medida que van surgiendo en el transcurso de la electroforesis, así cada uno de los cuatro colores representa una base diferente en el registro cromatográfico obtenido tras realizar medidas de fluorescencia a cuatro longitudes de onda y posteriormente se aprecian en el electroferograma. [30-31]

Características del método. [27]

Las principales características con las que cuenta la EC son las siguientes:

- La separación se desarrolla dentro de un tubo capilar.
- Utiliza campos eléctricos altos, a veces se superan los 500V/cm.
- Es sencillo de utilizar y fácilmente automatizable.
- Gracias a los modernos detectores y sistemas de registro, los electroferogramas son muy similares a cromatogramas de GC y HPLC.
- Es aplicable a una alta gama de analitos.

2.2.6 Interferencias en la tipificación de los STRs.

Cuando se analizan y *tipifican* los STRs pueden presentarse algunos inconvenientes que pueden interferir en la adecuada interpretación de los resultados. El principal y más común es la aparición de productos *stutter*, llamados también bandas tartamudas, o sombras de banda; estos los encontramos en casi todos los electroferogramas, son pequeños picos que aparecen inmediatamente antes o después del pico de un alelo real y son resultado del proceso de PCR cuando un STR loci es copiado por la ADN polimerasa. El mecanismo que se ha propuesto para explicar la existencia de los stutter es el “*slipped-strand*” o deslizamiento de la cadena, la polimerasa puede perder su lugar cuando copia una cadena de ADN, cuando esto ocurre una región del complejo primer-templado queda desapareada durante la extensión del *primer* permitiendo el deslizamiento de este o de una cadena del templado, de modo que forma una repetición de una cadena no apareada en una base. La consecuencia de esta repetición es un producto de PCR mas corto que el STR amplificado a un lado de la unidad repetida, generalmente se desliza cuatro pares de bases hacia atrás, pero en raras ocasiones también se presenta cuatro pares de bases hacia adelante. Como los productos stutter, en ocasiones son de la misma medida que un alelo real, pueden provocar confusión al momento de determinar si un pico pequeño es un alelo verdadero o producto de stutter y más aún en los casos en los que dos o más individuos son involucrados en una sola muestra. Por esta razón, es importante conocer el comportamiento de los picos stutter. [32-33]

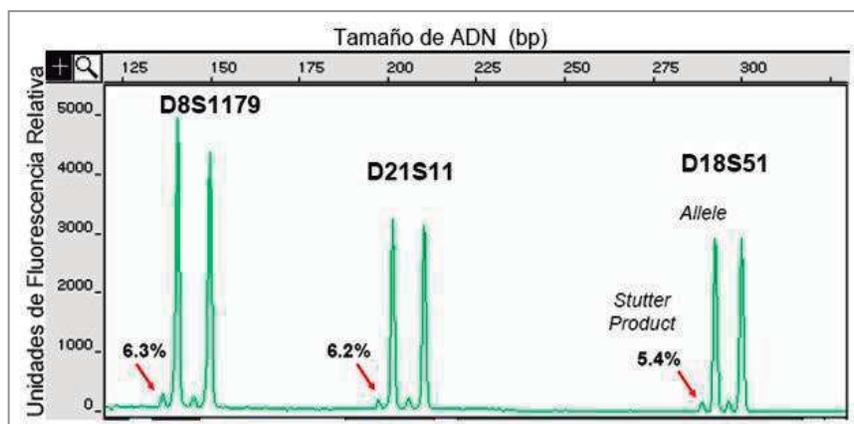


Figura 4. Ejemplo que muestra la aparición de los productos stutter -4 pb de un alelo verdadero en un electroferograma. [34]

El Dr. John Butler ha estudiado los STRs durante años y ha observado que los stutter son una unidad repetida más cortos, su altura es 15 % menor y se encuentran a -4 pb que los alelos reales, aunque es poco común que aparezcan a +4 pb suelen presentarse algunos casos. Ha estudiado que la producción de stutter puede disminuirse cuando se usan marcadores de STR de largas unidades o utilizando ADN polimerasas que copien rápidamente las cadenas de ADN antes de que pueda llevarse a cabo el deslizamiento de esta. [33]

Adicional a este tipo de interferencias, rara vez encontramos alelos en la población humana que difieran en uno o más pares de bases de los alelos que comúnmente son estudiados con los marcadores de ADN, estas variantes se denominan *microvariantes*, porque la diferencia es muy pequeña pero no son de la misma medida que los alelos conocidos y presentados dentro del estándar de la escalera alélica, lo cual puede ocasionar problemas en la interpretación de los STRs; cuando esto ocurre, estos nuevos alelos no pueden ser etiquetados dentro de la escalera alélica y se marcan como *“off-ladder”*. En un estudio reciente se analizaron 10000 muestras y se encontró que son más comunes en STRs que presentan alto polimorfismo.[35]

La presencia de tres bandas para un solo alelo también pueden aparecer como interferencia, esto no significa que sea tricigoto, ya que esto no puede ser posible, tampoco es consecuencia de una mezcla, también se ha encontrado que no se trata de una nueva microvariante, sino que son artefactos de la muestra que se reprodujeron y aparecieron en el electroferograma cuando la amplificación de los picos fue particularmente intensa, la formamida, el polímero o el capilar fueron de baja calidad o la desnaturalización fue inefectiva. Se han reportado más de 50 diferentes

tribandas que han sido observadas en los marcadores de los 13 CODIS, existiendo más frecuencia en el TPOX y FGA. Con el kit utilizado, pueden observarse tribandas en las regiones de D3S1358, TH01, D21S11 y Penta E del canal FL; en la región D13S317 y D16S539 del canal JOE; y en la región de vWA del canal TMR. Se pueden diferenciar porque generalmente los alelos heterocigotos son de similar intensidad y los que provienen de artefactos son más altos o más cortos. [22, 33]

Durante la PCR, la polimerasa usualmente adiciona un nucleótido extra al final de la reacción, generalmente es una “adenina”, proceso que es llamado *adenilación*, el cual ayuda a producir picos bien definidos en los electroferogramas. Cuando hay cantidades excesivas de ADN en la PCR puede dar como resultado la adenilación incompleta, lo cual produce picos que no están bien definidos y que están divididos provocando que los resultados no sean claros. Promega incluye una secuencia ATT en el extremo 5' de muchos de sus *primers* para promover la adenilación y de esta manera obtener picos más definidos. Finalmente, el imbalance en los picos *heterocigotos* también representa una interferencia muy importante, ya que lo ideal es que sean aproximadamente iguales y es muy común encontrar uno más pequeño que otro, lo cual puede confundirse con un *stutter* o algún otro *artefacto*. Se ha encontrado que se debe al uso de *bajas concentraciones de ADN*. [34]

Como se mencionó en este apartado, cuando se analiza el ADN suelen aparecer ciertos inconvenientes que pueden interferir en la interpretación de los resultados, es por ello que Promega sugiere a los laboratorios que utilizan sus productos, que realicen un estudio de validación interna para que identifiquen las condiciones en las que se presenta mayor incidencia de interferencias para que las eviten y trabajen de una manera más eficiente.

2.2.7 Validación de un método.

De acuerdo a la NMX-EC-17025-IMNC-2006, la validación es la confirmación, a través del examen y aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Cuando se habla en particular de la validación de un método, se dice que es el proceso de establecer las características de desempeño del método, así como de las limitaciones de este, identificando las condiciones que pueden modificar estas características y hasta qué punto pueden hacerlo, para comprobar que dicho método es adecuado a su propósito y que sirve para resolver un problema analítico particular.[35-36]

2.2.7.1 Objetivo de validar.

El objetivo es demostrar que un laboratorio está trabajando correctamente y dentro de los parámetros específicos usando un método adecuado para el análisis de una muestra particular utilizando un procedimiento determinado, instrumentos apropiados y con personal capacitado para demostrar que los resultados que se están obteniendo son confiables. Con la validación se obtiene información sobre el alcance o limitaciones que puede tener nuestro método si se somete a diferentes condiciones, de esta manera se puede utilizar dicha información para tener un mejor desempeño en el tratamiento de las muestras. [36, 47]

2.2.7.2 ¿Cuándo, cómo, porque y quién realiza la validación de un método?

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico particular. Por lo tanto la validación debe realizarse cuando: [36, 38]

- Se desarrolla un nuevo método para un problema específico y se quiere comprobar que es adecuado al fin propuesto;
- Un método ya establecido es revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema modificando el procedimiento del método;
- Si se realiza un control de calidad y se indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo y ya no satisface las necesidades;
- Se quiere comprobar que un método establecido usado en otros laboratorios, con diferentes analistas o con diferente instrumentación es confiable;
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia;
- Los laboratorios que tienen el propósito de acreditarse ante la **ema** tienen que validar sus métodos.

Para llevar a cabo la validación de un método se puede recurrir a estudios de colaboración con otros laboratorios comparando los resultados obtenidos, utilizando una misma metodología y mismas condiciones; o bien, se puede trabajar de manera independiente cuando el validar un método particular no es de interés para otros. Si se realiza de esta última forma, el laboratorio decidirá cuales parámetros de desempeño necesitan caracterizarse con el fin de validar el método.

Los requisitos de validación pueden ser especificados en guías dentro de un sector de mediciones relacionadas al método particular y se recomienda que si se tienen disponibles este tipo de guías, sean seguidas para saber cómo realizar la validación. [34]

La validación de los métodos es importante porque [36, 38-39]:

- Es necesario demostrar que un método es adecuado para su propósito y que los resultados obtenidos son confiables teniendo en cuenta los alcances y limitaciones de este.
- La norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 establece que los métodos normalizados que son usados fuera de su alcance, o que hayan sido modificados, así como los métodos no normalizados, diseñados o desarrollados por un laboratorio de calibración o ensayo, deberán ser validados.
- A diario la sociedad se respalda en una medición analítica para la toma de decisiones con propósitos de salud, legal, costo, control de calidad, etc.
- Es un requisito que se debe de cumplir para poder llevar a cabo el proceso de acreditación.

Es responsabilidad de cualquier laboratorio que utiliza o pretende utilizar un método específico, realizar la validación de sus métodos y asegurar que están validados adecuadamente y en los casos en los que trabaje con métodos ya validados, tendrá que adicionar información para complementar los datos y resultados ya existentes. [37, 40]

2.2.8 Técnicas de validación. [40]

Como anteriormente mencionamos, con la validación podemos determinar el desempeño de un método y para lograrlo se requiere emplear una técnica de validación. La nota 2 del apartado 5.4.5.2 de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 indica 5 técnicas usadas para validar métodos, estas no son obligatorias ni exclusivas dado que se encuentra en una nota de la norma, pero sirven como guía para iniciar con el proceso de validación. A continuación se mencionan las técnicas señaladas en la norma.

- *Calibración usando patrones de referencia o materiales de referencia.* Si los resultados son comparados con un patrón o material de referencia y existe coincidencia, se puede lograr la validación del método.
- *Comparación de resultados alcanzados con otros métodos.* Cuando los resultados de dos o más métodos coinciden usando patrones de referencia, prácticamente se garantiza la validez de los métodos que se compararon.
- *Comparaciones entre laboratorios.* Cuando los resultados de varios laboratorios coinciden y estos se obtuvieron con métodos distintos utilizando patrones de referencia, la validez de los métodos queda garantizada; sin embargo, si los resultados se obtuvieron por medio en un mismo método, la garantía de la validez puede ser limitada.
- *Evaluación sistemática de los factores que tienen influencia en los resultados.* La garantía de esta técnica es limitada, debido a que un método desarrollado incorrectamente puede tener errores sistemáticos que pueden causar en el resultado un efecto mayor al producido por los factores de influencia evaluados.
- *Evaluación de la incertidumbre de los resultados con base en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y de la experiencia práctica*

2.2.9 Tipos de validación.

Los tipos de validación se clasifican comúnmente en tres grupos, los cuales se mencionan a continuación.

- a) De acuerdo a las necesidades de la validación y al alcance del método tenemos dos tipos [38-39, 41]:

- **Validación parcial.** También conocida como verificación o confirmación, se utiliza para demostrar que los *métodos normalizados*, es decir, aquellos métodos que están publicados en normas como el Laboratorio Internacional de Cooperación para la Acreditación (ILAC), Organización Internacional de Estandarización (ISO), Unión Internacional de Química Pura y

Aplicada (IUPAC), Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), Asociación Científica dedicada a la Excelencia en Métodos Analíticos (AOAC), Norma Mexicana (NMX), Norma Oficial Mexicana (NOM), Administración de Alimentos y Drogas (FDA), etc., cumplen con las características de desempeño; también se debe de confirmar que es adecuado y, en caso de que este llegara a cambiar, debe volver a validarse. En la norma mexicana se indica que los laboratorios deben de usar preferentemente métodos normalizados que satisfagan las necesidades del cliente. En este tipo de validación se calculan los siguientes parámetros: incertidumbre, recuperación, límite de detección, límite cuantificación, intervalo lineal y de trabajo, reproducibilidad, repetibilidad y sesgo.

• **Validación total.** Esta validación se realiza cuando se utilizan métodos normalizados modificados, no normalizados, desarrollados por el laboratorio, obtenidos de revistas científicas o investigaciones, métodos publicados en directrices internacionales, regionales o nacionales, etc. La norma mexicana establece que es posible usar este tipo de métodos siempre y cuando estos sean apropiados y hayan sido validados. Además es necesario calcular: incertidumbre, recuperación, límite de detección, límite cuantificación, intervalo lineal y de trabajo, reproducibilidad, repetibilidad, sesgo, sensibilidad, selectividad y robustez.

b) De acuerdo a las características del método se clasifican tres grupos [41-43]:

• **Validación de métodos cuantitativos.** En estos métodos se cuantifica la cantidad de analito presente en una muestra para este existen guías claramente definidas para llevar a cabo la validación, en general, las guías establecen que se debe cumplir con los siguientes parámetros: linealidad, precisión, veracidad, límite de detección, selectividad, sensibilidad analítica, intervalo de trabajo, especificidad analítica e incertidumbre.

• **Validación de métodos cualitativos.** En este se determina la presencia o ausencia de uno o más analitos en una muestra considerando sus propiedades físicas, biológicas o químicas. No existen lineamientos claros para la validación de este tipo de métodos, los parámetros que se miden son distintos, los resultados se detectan de forma directa mediante los sentidos o de forma indirecta con el apoyo de instrumentos, la respuesta es de forma binaria, tal como: si/no, positivo/negativo, reactivo/no reactivo o presencia/ausencia. Los parámetros que se determinan deben estar basados en bibliografía técnicamente científica reconocida obtenida por el laboratorio y de acuerdo a las

características del método se calcula: valor discriminante, fenómeno de zona, interferencias, capacidad discriminante, sensibilidad y especificidad diagnóstica, probabilidad de falso positivo y negativo, límite de corte o cut-off, etc. según lo que aplique.

• **Validación de métodos semicuantitativos.** Se encuentran entre los métodos cuantitativos y cualitativos, y al igual que en los cualitativos los lineamientos existentes no son claros para llevar a cabo la validación. Ofrece una cuantificación con una incertidumbre importante, de acuerdo a la concentración de analito presente en una muestra ya que los resultados se determinan agrupándolos en tres clases: positivo (+ + +), positivo débil (+), zona gris (+ / -) y negativo (-). Los parámetros que se pueden determinar son: sensibilidad, especificidad, trazabilidad, selectividad, interferencias, límite de detección, límite de corte, incertidumbre, tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos.

c) En los procesos de fabricación de medicamentos existen 4 tipos básicamente:

• **Validación prospectiva:** es un estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto, y que se basa en un protocolo planificado. La validación de los procesos debe completarse normalmente antes de la distribución y venta del medicamento. [44-45]

• **Validación retrospectiva:** si un producto se ha venido produciendo por largo tiempo, pero no se ha validado de conformidad con un protocolo prospectivo, puede efectuarse una validación retrospectiva. [46]

• **Validación concurrente:** se validan los procesos durante la producción habitual, los datos de validación se reúnen durante varios ciclos del proceso continuo y se evalúan para determinar si éste es válido. Se debe redactar un protocolo para definir la información que ha de recogerse y evaluarse. [45-46]

• **Validación a escala de laboratorio y a escala piloto:** cuando la validación de ciertos procesos de producción no puede efectuarse en la planta de producción, se lleva a cabo en escala piloto, la cual es una escala intermedia que a veces se usa para determinar la validez de procesos nuevos o modificados, antes de emprender las operaciones a escala industrial. Para que estos estudios de validación puedan aceptarse como prueba de la validez del proceso a escala industrial,

es preciso demostrar que se han hecho cálculos a escala menor de todos los parámetros críticos del proceso: tiempos, temperaturas, cantidades, dimensiones de las columnas, velocidades de flujo, presiones, etc. [46]

2.2.10 Proceso de validación

Anteriormente, se mencionó que los laboratorios deben de validar sus métodos con la finalidad de que el laboratorio ofrezca un servicio adecuado a las necesidades de sus clientes y que al mismo tiempo cumpla con lo establecido en las normas oficiales. Primero, debe de especificarse qué tipo de validación se realizará, si será total o parcial y si esto depende tanto del método que se usa en el laboratorio como de las características de este, ya que se tiene que definir si es un método normalizado, normalizado modificado, no normalizado, desarrollado por el laboratorio, etc. así como determinar si es cualitativo o cuantitativo. Posteriormente se establecen los parámetros que se van a medir para cumplir con los requisitos técnicos establecidos en las normas. Una vez que se tiene establecido lo anterior, se procede a realizar las mediciones y cálculos correspondientes. [36, 46]

La norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 indica que deben de cumplirse ciertos parámetros para llevar a cabo la validación de métodos cuantitativos y el criterio de la **ema** establece que para métodos cualitativos y semicuantitativos se determinan otros parámetros de acuerdo a las características del método, siempre y cuando esté basada en bibliografía técnica y científicamente reconocida, obtenida por el laboratorio. La validación debe ser tan extensa como sea necesario para cumplir con las necesidades o campo de aplicación dados. El laboratorio debe de registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto. [34, 43]

En nuestro país las normas existentes no cuentan con información sobre la validación en el área de Genética Forense y en general, información sobre la validación de este tipo de métodos, de igual forma son muy escasas las guías que puedan ser de utilidad para establecer los parámetros que se deben evaluar. Los resultados que se obtienen en el área de Genética Forense son cualitativos y los parámetros que comúnmente se calculan para otras validaciones no aplican como tal en ésta área.

En Genética Forense generalmente se considera que hay dos etapas de validación: [19]

- **Validación de desarrollo** consiste en el análisis de los loci STR o de los nuevos kits de STR, nuevos sets de *primers* y nuevas tecnologías para detectar los alelos de STR. Usualmente la realizan los fabricantes comerciales de kits y laboratorios grandes como el Laboratorio del FBI.
- **Validación interna**, por el contrario, consiste en verificar que los procedimientos establecidos anteriormente con el control de la validación del desarrollo, trabajará de manera efectiva en su propio laboratorio. La realizan los laboratorios más pequeños que analizan el ADN y laboratorios forenses de gobierno.

2.2.11. Parámetros a evaluar en la validación interna del kit PowerPlex® 16 HS.

Con la finalidad de que los laboratorios de Genética trabajen de una manera adecuada y con un buen desempeño, Promega publicó la guía “Internal Validation of STR Systems”, para que los laboratorios que utilizan este kit realicen una validación interna. A continuación se puntualizan cada una de las mediciones y cálculos que se deben realizar para la validación interna.

2.2.11.1 Análisis del umbral.

De acuerdo a la guía de Promega el *análisis del umbral* se realiza calculando el límite de detección y establece que es la señal más baja que puede ser detectada por arriba de la línea base. La guía de Eurachen de CENAM-ema define el *límite de detección* como la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba. [36]

El límite de detección puede determinarse amplificando 5 blancos de agua grado amplificación, utilizando diferentes condiciones de inyección para observar el *ruido* producido en la línea base del equipo de EC. El límite de detección es aproximado a la media de la altura de la línea base del ruido, en RFU, mas 3 desviaciones estándar.[48]

A continuación se muestra la fórmula empleada para calcular el límite de detección, representado como LD:

$$LD = \mu + 3\sigma \text{ [Ecuación 1]}$$

Donde:

μ = media

σ = desviación estándar

2.2.11.2 Sensibilidad.

La sensibilidad analítica es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito [36].

La guía de Promega establece que es la mínima concentración que produce un perfil completo de ADN con las alturas de los picos por encima del umbral de análisis en un instrumento de EC, usando condiciones de inyección y número de ciclos específicos. [48]

El perfil de ADN completo está constituido por 16 marcadores.

2.2.11.3 Rango dinámico.

La guía lo define como la relación que existe entre el límite de detección del extremo inferior del rango del instrumento y el límite de linealidad del extremo superior [48]. La linealidad es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito [36].

La concentración de ADN amplificada bajo un número de ciclos específico y analizado utilizando parámetros de inyección específicos, los cuales dan como resultado la saturación del detector, de tal manera que un nuevo aumento en la concentración pierde el aumento lineal de la señal. Una gráfica que muestre la altura de los picos vs la concentración de ADN permite determinar el rango dinámico, la menor y mayor concentración de ADN que puede ser detectada, además se puede determinar la concentración a la cual se produce la altura ideal de los picos y con

un perfil completo. Se determina analizando y amplificando muestras en 5 réplicas, que contengan 2 ng, 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.1 ng, 0.05 ng y 0.03 ng de ADN, para un total de 35 perfiles. [48]

Altura ideal de los picos es de 1000 - 4000 RFU.

El perfil de ADN completo está constituido por 16 marcadores.

2.2.11.4 Umbral estocástico.

El umbral estocástico se define como la altura de los picos (RFU) o concentración de ADN amplificado, en el cual, los *alelos heterocigotos*, también conocidos como hermanos, presentan un severo *imbalance de los picos*. Este imbalance se debe generalmente a una cantidad insuficiente de ADN en la amplificación. Como la concentración disminuye, las posibilidades de error en el muestreo aumentan de tal manera que un alelo de un par heterocigoto puede no estar igualmente representado, resultando en un imbalance en los alelos amplificados.

Una manera de determinar la relación de altura de los picos heterocigotos mínima aceptable es calculando la media de la *Proporción* (Ratio), así como la desviación estándar de las muestras analizadas para el rango dinámico. Se puede graficar *% de proporción* de la altura de los picos vs altura de los picos en RFU. Cualquier proporción *por debajo de 61% se puede considerar que tiene un incremento significativo en el imbalance de los picos*. [48]

% Proporción de la altura de los picos debe ser mayor a 61%

El umbral estocástico también puede ser definido en términos de concentración, determinando en cuál de ellas el porcentaje de heterocigotos muestra un severo imbalance en los picos o en cual hay un incremento en la variación en la proporción de la altura de los picos. La ventaja de definir el umbral estocástico en términos de concentración de ADN en lugar de la altura de los picos, es que la concentración es independiente de las condiciones de inyección y de la sensibilidad de los instrumentos de CE. Los niveles de umbral estocástico deben considerarse cuando se analicen muestras que contengan bajas concentraciones de ADN. [47,49]

2.2.11.5 Precisión y reproducibilidad.

Para determinar estos parámetros, se deben inyectar de 5 a 10 muestras, incluyendo la escalera alélica, en 5 replicas por separado en el instrumento de CE, usando las condiciones de inyección ya determinadas. Se pueden usar las mismas muestras empleadas para el estudio del rango dinámico y umbral estocástico. Se debe determinar el promedio (media) de las medidas de los alelos en pb, y la desviación estándar. Idealmente, tres veces la desviación estándar debe ser menos de 0.5 pb. [48]

3 σ del promedio de la medida de los alelos debe ser menor que 0.5 pb.

2.3 MARCO JURÍDICO

En este marco se hace referencia a normas y leyes mexicanas e internacionales que están relacionadas con el tema, se engloban en dos apartados, en el primero se mencionan brevemente los códigos que tienen una importancia de carácter legal al realizar un examen genético y el segundo comprende los requisitos que se deben de cumplir para llevar a cabo el proceso de validación.

Dada la importancia legal que tiene realizar una prueba genética, ya sea de identificación de personas o de comprobación de filiación, es relevante hacer una breve mención sobre los derechos que se tienen en nuestro país cuando se lleva a cabo una prueba pericial de genética, esto con la finalidad de resaltar la importancia que tiene la validación de nuestro método, ya que de no obtenerse resultados confiables estamos en riesgo de reportar información errónea que pueden tener consecuencias futuras desfavorables para los clientes.

Para poder llevar a cabo el proceso de validación de una manera adecuada es necesario conocer las normas que regulan el proceso y así cumplir con lo establecido. En México la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 es la equivalente a la norma internacional ISO 17025 y son las que establecen los requisitos que deben de cumplirse para poder realizar la validación de los métodos.

2.3.1 Aspectos Legales.

La prueba pericial en genética en los laboratorios de la PGJE se realiza en gran número de casos para comprobar la filiación de padre a hijo con la finalidad de resolver casos de manutención, herencias, patria protestad, etc. Se entiende por *filiación* al vínculo jurídico que une a un hijo con su padre o con su madre y que consiste en la relación de parentesco establecida por la ley entre un ascendiente y su inmediato descendiente [50]. Además esta prueba se realiza con otros fines como para la identificación de cadáveres, violaciones, prueba de maternidad o hermandad, etc.

En nuestro país aparte de la Constitución Política existen diferentes Códigos Civiles y Penales, tanto estatales como federales que nos rigen para asegurar el bienestar de las personas, principalmente de los menores. En estos documentos encontramos artículos relevantes sobre la paternidad y filiación que son de interés social y de orden público, en ellos se indica el proceso que debe de seguirse en los juicios civiles y penales en los que se requiere comprobar la paternidad.

La ley reconoce como medios de prueba cualquier elemento que la ciencia aporte para saber la verdad y resolver los casos a los que se enfrenta la justicia a diario. Se establece que se puede hacer uso de la ciencia siempre y cuando el método que se utilice sea altamente confiable y que los resultados que aporte sean correctos. El juez, una vez que revisa los resultados que se obtuvieron en el laboratorio, se basa en ellos para dar su veredicto. De ahí la importancia que tiene la validación de los métodos, porque con ello nos aseguramos que lo que obtiene es confiable. [51]

2.3.2 Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006.

Existen instituciones que se encargan de la acreditación de los laboratorios y normalmente son estas las que establecen los requisitos que se deben de cumplir en los procesos de validación. Para llevar a cabo la normalización de un método contamos con guías que nos orientan para aplicar las herramientas adecuadas a las características del método. Nuestro estudio se basa en la guía estadounidense de Promega Corporation, “Internal Validation of STR Systems” revisada en 2006 y publicada por el FBI, la cual establece el estudio que deben elaborar los laboratorios que realizan la prueba genética de ADN utilizando el kit comercial PowerPlex[®] 16 HS para la tipificación de STR y de esta manera validar el proceso. En nuestro país las instituciones que se encargan de la Acreditación de los laboratorios se basan en un sistema de gestión de calidad que hace uso de las normas mexicanas, principalmente en la NMX-EC-17025-IMNC-2006, “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración” que es la equivalente a la norma ISO/IEC 17025. En la cual se establece que se debe de cumplir con los siguientes requisitos:

2.1.4 Validación de los métodos [34]:

- 2.1.4.1 La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico previsto.
- 2.1.4.2 El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados fuera del alcance previsto, así como las aplicaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación de los datos.
- 2.1.4.3 La gama de exactitud de los valores que se obtienen empleando métodos validados, por ejemplo, limite detección, la sensibilidad del método, el límite de repetibilidad o de reproducibilidad o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo, deben de responder a las necesidades de los clientes.

El laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la validación del método, registrando los resultados obtenidos e indicar el procedimiento que se utilizo para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.

2.4 MARCO FILOSOFICO.

Este marco describe brevemente el estudio filosófico de la ciencia, ya que si nos preguntamos cómo es que nació la ciencia tenemos que recurrir a la filosofía de la ciencia que es la disciplina que explica el origen de la investigación científica. [52]

El hombre se ha preocupado siempre por la investigación en el área biológica y ha brindado un sinnúmero de beneficios para la humanidad dado que ha mejorado la calidad de vida de las personas con ayuda de la ciencia y la tecnología. Como regla general, la investigación científica siempre debe enfocarse en lograr el bienestar de la humanidad, lamentablemente hay quienes hacen mal uso del conocimiento aplicándolo deshonestamente con el fin de perjudicar a las personas.

En base a lo anterior, se muestra un apartado sobre la importancia de la Bioética, ya que debe ser un tema de interés para todas las personas que estudian, laboran, investigan o se relacionan de alguna manera en el área de la salud, trabajan en el desarrollo de proyectos de investigación científica o trabajan en el área de criminalística. El propósito primordial de la Bioética es hacer conciencia en que la utilización del conocimiento en la investigación debe enfocarse en lograr el bienestar de la humanidad, siempre respetando la dignidad y los derechos de los seres humanos, así como del medio ambiente y del planeta, teniendo en cuenta que es nuestra responsabilidad la calidad de vida de las generaciones presentes y más aun de las futuras.

2.4.1. Filosofía de la ciencia.

Desde que el hombre apareció en la tierra se ha dedicado a la observación de los fenómenos naturales que ocurrían a su alrededor, comenzó la búsqueda de instrumentos que le permitieran ver lo que sus ojos no alcanzaban a percibir y se adentró a mundos macro y microscópicos para explorarlos, adquirir conocimiento y con ello conocer la verdad de las cosas.

Desde siempre el ser humano ha tratado de comprender la vida y ha intentado ordenar el mundo con lógica, gracias a su inteligencia, mediante la percepción de las cosas, la capacidad de análisis y la experimentación. La percepción, la intuición y la lógica son las tres armas utilizadas por el hombre para aumentar su dominio sobre la naturaleza, así se dio el origen de la filosofía de la ciencia. La filosofía analiza el mundo de lo posible y la ciencia se limita al mundo de lo probado y pretende alcanzar la verdad mediante el uso exclusivo de la razón. [52]

2.4.2. Bioética.

Se sabe que en tiempos pasados el hombre, con su interés por conocer más, realizó experimentos brutales con seres humanos con la finalidad de encontrar la cura para las diversas enfermedades que lo atacaban sin importarle el sufrimiento de las personas que eran sometidas a estudio. Las investigaciones que se realizaron de esta manera tenían que frenarse buscando otra alternativa de estudio, así comenzó la experimentación con animales para evitar lastimar a los humanos. Debido a esta problemática, hace algunos años nació la *Bioética*, que según la enciclopedia de Bioética la define como: “el estudio sistemático de la conducta humana en el área de las ciencias de la vida y del cuidado sanitario, en cuanto que tal conducta se examina a la luz de los valores y de los principios morales”, esta disciplina relaciona la medicina, la filosofía y la ética. La Bioética tiene cuatro principios fundamentales, los cuales son: principio de no maleficencia, principio de justicia, principio de autonomía o libertad de decisión y principio de obligación de hacer el bien, esto nos hace reflexionar sobre el hecho de que no es lícito imponer a otros nuestra propia idea del bien. Tan relevante es este tema que la UNESCO en 2005 aprobó la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos en la cual se enuncian cuestiones éticas relacionadas con la medicina, ciencias de la vida y la tecnología aplicada a los seres humanos, en ella establece que se debe salvaguardar la dignidad humana y los derechos humanos. [53-54]

Actualmente la sociedad enfrenta nuevos problemas relacionados con la Genética como la clonación, la manipulación genética, obtención del perfil genético, entre muchos otros, que son temas muy discutidos. Se ha observado que a medida que aumenta el conocimiento, nos enfrentamos a cuestiones éticas más difíciles que pueden tener consecuencias desfavorables para las generaciones futuras. [54]

2.4.2.1 Criminalística y ética.

La investigación pertinente, adecuada y eficaz respecto a los delitos que se cometen en una comunidad social determinada, constituye la base de las instituciones públicas encargadas a estas importantes y difíciles tareas. La criminalística es la ciencia mediante la cual se procede al examen de indicios o evidencia de diverso origen y naturaleza, por parte de expertos forenses con el objeto de aportar información que sirva de ilustración para un proceso judicial, social, penal, administrativo, etc. En la actualidad las investigaciones se han aumentado y sofisticado pero se han tornado más violentas, peligrosas y faltas de ética profesional. [56]

El objetivo del investigador criminal es la búsqueda y obtención de pruebas que vinculen a un hecho delictivo con quien lo realizó con la finalidad de conocer la verdad, teniendo en cuenta que el trabajo del investigador no debe perder de vista las garantías constitucionales y los derechos humanos, la aplicación estricta de la ley, la confidencialidad, la ética y la moral. Cuando se investiga no se adopta sólo una posición intelectual ante la realidad sino también, una posición ética en la cual se debe defender la verdad de los hechos para salvaguardar el bienestar de las personas inocentes y, de esta manera, hacer pagar a las personas que de alguna manera violan la ley. Como profesionistas, debemos de tener presente la ética y la moral ante todo. [56-57]

2.5 MARCO HISTORICO

Debido a que el tema de validación en el área Genética Forense es muy reciente, contamos con pocos recursos que nos orienten, es por ello que se revisan artículos de estudios ya realizados que se relacionan con el nuestro, los cuales nos aportan herramientas muy útiles para poder llevar a cabo la validación de nuestro método.

Inicialmente se muestra el avance que se ha tenido en la elaboración de guías para llevar a cabo la validación de los métodos, se mencionan las organizaciones que comenzaron a validar para demostrar que un método funciona adecuadamente y con el cual se obtienen resultados confiables. Posterior a esto mencionaremos los artículos revisados.

Este marco es importante porque en el recopilamos información de estudios anteriores que nos ayudarán a tener una visión más amplia sobre el tratamiento e interpretación de los datos, para poder cumplir nuestra hipótesis planteada.

2.5.1 Inicio de la validación.

La validación de los métodos es conocida como parte necesaria de todo sistema de garantía de calidad para los laboratorios, dada la importancia que tiene demostrar que un método es adecuado a su propósito y que mediante el se obtienen resultados confiables ISO, IUPAC y AOAC INTERNATIONAL desde hace años se preocuparon por elaborar protocolos comunes sobre realización e interpretación de estudios de la eficiencia de los métodos, ensayos de aptitud de laboratorios de química analítica, control interno de calidad en laboratorio, entre otros. [37]

Actualmente la IUPAC se ha encargado de elaborar protocolos para establecer directrices de validación de métodos de análisis, las cuales ofrecen recomendaciones mínimas sobre los procedimientos que deben seguirse para garantizar una validación adecuada de los métodos analíticos. [37]

2.5.2 Estudios relacionados con la tipificación de los STRs loci del ADN.

Los marcadores de STRs fueron descritos por primera vez como herramienta para exámenes de identificación a inicios de 1990 y desde entonces se han realizado investigaciones para mejorar el poder de identificación aumentando el número de STRs aunque también se han estudiado los inconvenientes que se presentan durante el proceso de la tipificación que pueden intervenir en la interpretación de los resultados, a continuación se mencionan artículos de investigación que contienen información relevante sobre el sistema de STRs y las interferencias más comunes. [16]

2.5.2.1 Genética y Genómica la base de los loci Short Tandem Repeats usados en exámenes de identidad humana. [16]

El sistema de identificación humana mediante los loci STRs es un proyecto que comenzó hace más de dos décadas y posteriormente surgió el CODIS. Durante este tiempo varios laboratorios y empresas han ido enriqueciendo la información sobre los STRs ya que se han realizado estudios y evaluaciones, se establecieron bases de datos de la población y la validación en el área forense condujo a varios sistemas de investigación de los STRs. Inicialmente se trabajó con los STRs detectándolos en geles de poliacrilamida con tinción de plata y actualmente con la

tecnología que contamos se utiliza detección fluorescente y electroforesis capilar con instrumentos como los analizadores genéticos. Se han utilizado nuevos loci como lo es la Amelogenina, Penta D, Penta E, F13A1, D19S433, SE33, D2S1338, entre otros, que han aumentado el poder de discriminación e identificación humana.

La tipificación de los STRs usualmente se realiza utilizando medidas de comparación mediante escaleras alélicas estandarizadas que contienen los alelos más comunes, que han sido secuenciados para identificar el número de repeticiones que contiene cada uno. Las escaleras alélicas son proporcionadas por los productores de los kits de STR los cuales son ligeramente diferentes en los rangos alélicos de un productor a otro. Esos estándares se han ido enriqueciendo a medida que se analizan perfiles genéticos, porque han ido apareciendo nuevas microvariantes entre las poblaciones.

Los fragmentos de STRs son solo el 3% aprox. de la secuencia total del genoma humano, sin embargo el sistema de los marcadores de STR es una herramienta sumamente importante para la identificación humana que continuará utilizándose por muchos años más porque contienen un alto grado de variabilidad y son fácil de usar en las amplificaciones. Este sistema ha demostrado su efectividad porque en los últimos años se han resuelto numerosos casos criminales y de parentesco. Los kits comerciales de STR permiten una amplificación confiable de los loci a partir de muestras con bajas concentraciones de ADN.

2.5.2.2 Variación magnitud-dependencia en el balance de la altura de los picos de los STR heterocigotos. [58]

Numerosos estudios muestran que la señal de los alelos heterocigotos es aproximadamente igual, pero suele ocurrir que en los STR heterocigotos, uno de los picos sea más pequeño. En ocasiones la magnitud es 70% menos que el pico mayor, en algunos casos se calcula el área, se ha estudiado que este imbalance en los picos indica que más de una persona está involucrada en la muestra de ADN que se analizó. De manera similar si el menor de los picos es igual o sobrepasa 70% de la altura o área, del pico más alto del locus, se considera que la muestra de ADN proviene de una sola persona.

En la práctica general se ha demostrado que la relación entre la altura de los picos, “*peak height ratio*”, del alelo menor dividido entre el alelo debe ser mayor que 70% en una muestra que provenga de sola fuente. De acuerdo a lo anterior la **proporción** o relación de la altura de los picos se calcula mediante la fórmula que a continuación se muestra:

Cálculo de la proporción para alelos heterocigotos:

$$\% \text{ Proporción} = \frac{\text{altura del pico menor(RFU)}}{\text{altura del pico mayor(RFU)}} (100) \text{ [Ecuación 2]}$$

La publicación más completa sobre el estudio del imbalance de los picos es asociado con la validación del TWGDAM de los kits de amplificación AmpFLSTR® PCR para casos forenses de ADN. Este estudio sugiere que el imbalance en la altura de los picos varía de modo que es inversamente proporcional a la concentración. Otros encontraron que el imbalance en los picos es exagerado, incluso hasta el punto que el alelo no se detecta, *cuando las concentraciones de ADN son menores de las recomendadas por los productores de los kits*. En éste estudio se analizaron 1763 pares de alelos heterocigotos de muestras de referencia y controles positivos, el resultado obtenido en los electroferogramas mostraron que el umbral de imbalance es menor en los alelos con bajas alturas de los picos y mayor para los alelos que presentan una mayor altura de los picos.

2.5.2.3 Análisis sistemático de los porcentajes de stutter, altura de los picos de los alelos y la relación de las áreas de los STR heterocigotos en casos forenses de trabajo y muestras de bases de datos. [59]

El sistema de los STR ha sido utilizado ampliamente en los últimos años en casos forenses en los que se recolectan muestras biológicas en la escena del crimen para establecer la presencia de ADN de un agresor y el de su víctima, sin embargo las muestras obtenidas generalmente están constituidas por mezclas de sustancias corporales procedentes de más de un individuo y por lo tanto los perfiles de ADN están mezclados interfiriendo en la interpretación de los resultados. En estos casos, la tipificación del ADN presenta tres principales interferencias:

1.- Productos stutter, que como se menciona en el capítulo II, se producen en el proceso de la amplificación por el deslizamiento de la ADN polimerasa;

- 2.- El imbalance en la altura de los picos o en el área de los loci heterocigotos, por lo que es difícil identificar si se trata de un alelo heterocigoto o si en realidad es un alelo homocigoto de la víctima y otro homocigoto del perpetrador. Este imbalance también se presenta por los efectos estocásticos cuando en la amplificación del ADN se utiliza baja concentración, el ADN está degradado o por la falta de eliminación de inhibidores de la PCR durante el proceso de la extracción;
- 3.- La imprevisibilidad para identificar el número de alelos que son compartidos por los involucrados puede reducir la habilidad para identificar los perfiles individuales en una muestra.

En este estudio se realizó una validación en la que se reportó el % de stutter y la *proporción* de la altura de los picos heterocigotos de 275 casos de trabajo analizadas con el kit AmpF/STR® Profiler Plus™ (PP) con el secuenciador ABI 377 DNA, un número similar de muestras originales, n=468, fueron usadas para proporcionar valores de referencia adecuados y compararlos con los datos de los casos de trabajo. En ambos grupos de muestras se determinó el % de stutter en altura de los picos y en área, se observó que el % de stutter varía de un locus a otro incrementando con el número de repeticiones. Para los marcadores D5S818, D13S317 y D7S820 el % de stutter fue más bajo que en otros loci para ambos grupos de muestras. Cuando se definió la media del % de stutter +2 SD y +3 SD los resultados fueron similares entre los dos grupos.

No se mostraron diferencias significativas entre el cálculo de la *proporción* mediante la altura y el cálculo por medio del área de los alelos. Las medias de las proporciones fueron aprox. $93\% \pm 6.5\%$ para las muestras de la base de datos y $88\% \pm 12\%$ para las muestras de casos de trabajo. A 3 desviaciones estándar por debajo del valor de la media, el límite inferior del rango en que dos picos deben ser considerados como perfiles separados sería 73% y 52% para las muestras de base de datos de la población y de casos de trabajo respectivamente.

2.5.2.4 Validación del kit PowerPlex® 16 de Promega para las pruebas de paternidad.

[60]

En este estudio de validación se compararon dos kits que la compañía Promega lanzó al mercado hace algunos años, el PowerPlex® 1.1 y el PowerPlex® 2.1 con el nuevo PowerPlex® 16 para comprobar la efectividad que tiene este último en los casos en los que se requiere demostrar la paternidad, ya que cuenta con tres loci adicionales a los del CODIS, Penta E, Penta D y Amelogenina. Se analizaron 10 muestras de casos de paternidad usando el kit PowerPlex® 16 y

analizándolas mediante el ABI PRISM™, las mismas muestras se analizaron con los otros dos kits utilizando el analizador Hitachi FMBIO®. Estudios posteriores demostraron que hubo variación entre el PowerPlex® 1.1 y el PowerPlex® 16; los resultados indicaban que con el kit PowerPlex® 1.1 había exclusión del padre y la madre y al ser analizadas con el kit PowerPlex®16 mostraron inclusiones genotípicas de los padres.

El estudio de validación se llevó a cabo de la siguiente manera, antes de analizar las muestras recolectadas, se utilizaron muestras de referencia de ADN que Promega Corporation proporcionó para estandarizar las condiciones de amplificación con las cuales se iba a trabajar para validar los instrumentos. Los resultados óptimos sugeridos por Promega incluyen: altura de los picos entre 200 y 5000 RFU, bajo nivel de productos stutter y amplificación clara en todos los marcadores. El laboratorio eligió trabajar con 1 ng de ADN, en 25 µl de volumen total de la mezcla y a 10/20 ciclos de amplificación/temperatura en el termociclador Perkin Elmer 9700 para obtener resultados óptimos con el instrumento ABI PRISM™ 377. Las condiciones antes mencionadas fueron usadas para amplificar 350 muestras el *Crime Laboratory* de Wisconsin con el kit PowerPlex® 16 y los resultados fueron comparados con los resultados obtenidos de las mismas muestras analizadas con Plus™ y el COfiler™ multiplex kits, obteniendo como resultado una completa concordancia.

Este capítulo mostró la importancia que tiene la validación de los métodos porque con ello los laboratorios aseguran que están trabajando de una manera adecuada y que los resultados obtenidos son confiables. Como se mencionó anteriormente, la validación en el área de Genética Forense es muy reciente de modo que se han adecuado parámetros, de acuerdo a las características del método, para implementar la validación. Una vez que se hizo la revisión teórica sobre la **tipificación** de los STRs, los estudios realizados y los parámetros que se pueden evaluar en nuestro estudio, podemos describir la metodología que se utilizó, así como la técnica empleada para el análisis del control positivo 9947A utilizado, lo cual se describe en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODO.

*“Si me ofreciesen la sabiduría con la condición de guardarla
para mí sin comunicarla a nadie, no la querría”*

Lucio Anneo Séneca

3.1 PROCEDIMIENTO

Este capítulo tiene como propósito revisar la metodología que se llevó a cabo para la realización del estudio de investigación así como mostrar la técnica que se siguió durante el análisis del blanco y del control positivo de ADN 9947A en las diferentes etapas del proceso.

Inicialmente se describe el método empleado, continuando con las especificaciones de los manuales de apoyo, material y reactivos utilizados en la parte experimental. Finalmente se describe la técnica empleada para la preparación de los reactivos y muestras, mostrando una explicación detallada del procedimiento utilizado en el laboratorio de Genética Forense.

La importancia que nos brinda este capítulo es que en el especificamos como llevar a cabo el análisis del control positivo de ADN para la *tipificación* de los STRs, porque si el proceso no está bien definido se pueden generar errores durante la parte experimental que pueden llevarnos a resultados incorrectos y por lo tanto analizar y concluir de manera equivocada los datos obtenidos, influyendo en hipótesis planteada al inicio del trabajo.

3.2 MÉTODO

El método de investigación que utilizamos en nuestro estudio es el *método deductivo* debido a que es conveniente realizar un análisis de los parámetros que Promega ha especificado que son importantes para realizar la validación interna del kit, así como los estudios ya realizados que aportan información esencial para el nuestro.

El método que se usa en los laboratorios de Genética Forense de la PGJE para la tipificación de los STR mediante EC utilizando este kit, es un sistema que analiza una muestra de ADN con rapidez, comparado con otras técnicas y además cuenta con una alta confiabilidad en los resultados dada baja probabilidad de error que tiene al utilizar los 13 STRs del CODIS y tres loci adicionales, el Penta E y Penta D y como se mencionó en el capítulo II, aumentan considerablemente el poder de discriminación del sistema para resolver casos de paternidad así como en los que hay mezclas de ADN y la Amelogenina o AMEL, que no es un STR pero es de gran utilidad ya que muestra una banda específica en los cromosomas X y Y para permitir la identificación del sexo de cada muestra.

El presente estudio de validación interna será de gran utilidad para el laboratorio de Genética Forense porque con él se obtendrán las características que presenta el kit bajo las condiciones de trabajo que comúnmente son utilizadas en el laboratorio, tomando en cuenta las interferencias y variaciones que pueden presentarse en los electroferogramas en relación a las concentraciones de ADN. Se utilizó el control positivo de ADN 9947A proporcionado por el kit, para lograr la tipificación todos los STRs.

3.3 MATERIAL Y EQUIPO.

A continuación se detalla la información sobre los manuales, material, y equipo empleados para realizar las mediciones y cálculos en el estudio de validación interna.

MANUALES:

- Manual tecnico PowerPlex® 16 HS system. LQGF-D5.4-02-01.
- Manual tecnico del termociclador GeneAmp® PCRSystem 9700. LQGF-F4.3-04-01-01.

REACTIVOS:

Kit de reactivos para pre-amplificación (GE-MRILS-01)

- PowerPlex® HS 5X Master Mix.
- PowerPlex® 16 HS 10X Primer Pair Mix.
- 9947A ADN.
- Agua grado amplificación.

Kit de reactivos post-amplificación (GE-MRILS-01)

- PowerPlex® 16 HS Allelic Ladder Mix.
- Internal Lane Standard (ILS) 600.
- Hi-Di™ formamida.

EQUIPO:

Equipo instrumental para pre-amplificación:

- Termociclador GeneAmp® PCR System 9700 GE TER-02.
- Microcentrifuga GE MCNT-01.
- Pipetas GE-EMP-05 de 20-200 µl, GE-EMP-08 de 0.5-10 µl.
- Vortex GE VTX-04.

Equipo instrumental post-amplificación.

- Analizador Genético ABI PRISM® 310 02. GE SEC-02
- Micropipetas GE-EMP-01 de 0.5-10 µ, GE-EMP-02 de 10-100 µl GE-EMP-03 de 100-1000 µl.

Para el análisis de los datos se utilizó: Microsoft Excel Office 2007.

3.4 TÉCNICA.

3.4.1 Preparación de las muestras.

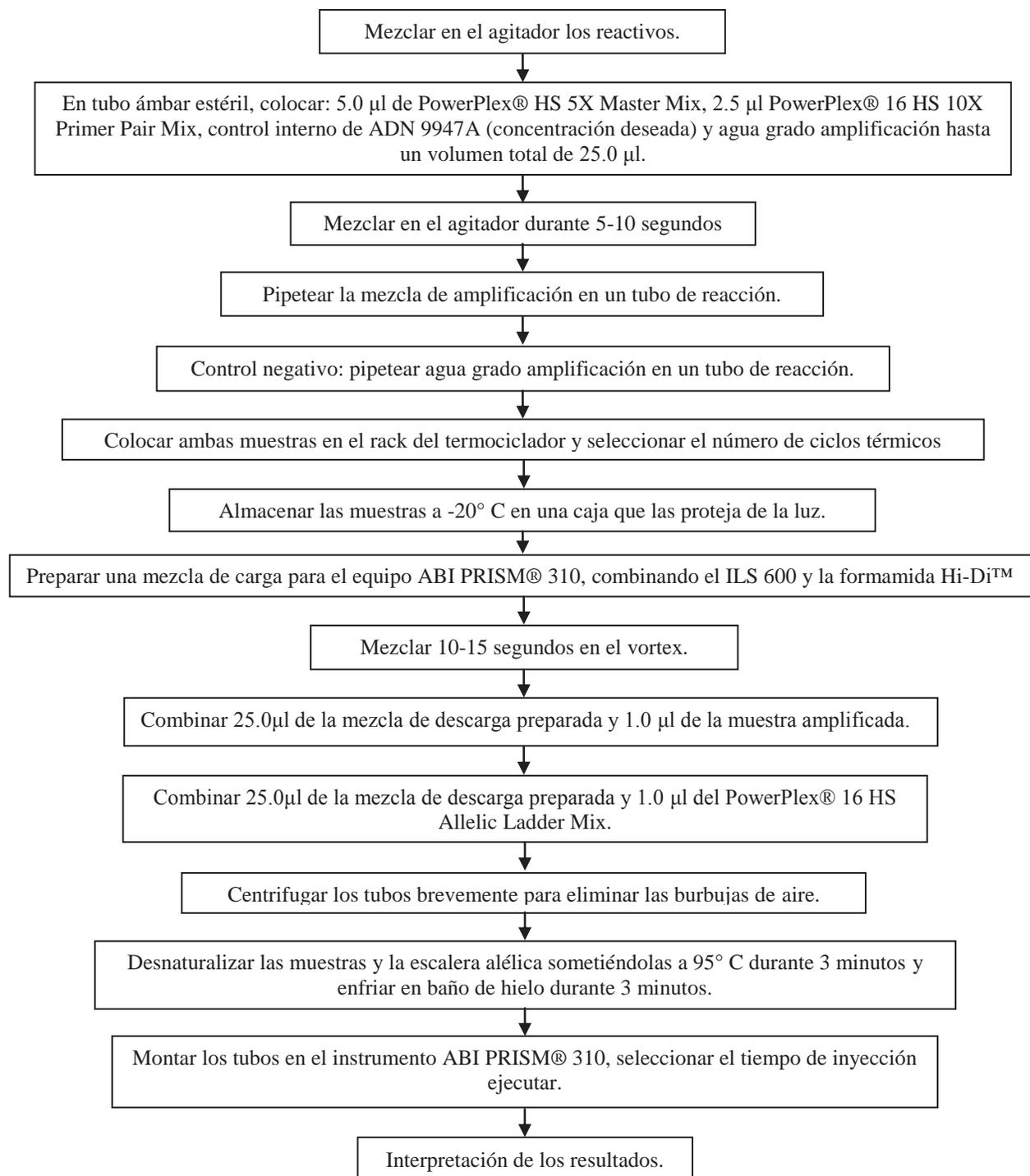


Figura 5. Procedimiento general para la preparación de las muestras, ver texto para más detalles.

La calibración del equipo se llevó a cabo de acuerdo al manual técnico, el proceso de preparación de las muestras se describe a detalle a continuación:

1. Descongelar y mezclar en el agitador los reactivos.
2. Colocar 5.0 µl de PowerPlex® HS 5X Master Mix, 2.5 µl PowerPlex® 16 HS 10X Primer Pair Mix, control interno de ADN 9947A (concentración deseada) y agua grado amplificación (hasta un total de 25.0 µl), en un tubo ámbar estéril de 1,5 ml.
3. Mezclar en el agitador la mezcla de amplificación de PCR durante 5-10 segundos, después pipetear la mezcla en cada tubo de reacción.
4. Para el control negativo o blanco, pipetear agua grado amplificación en un tubo de reacción que contiene la mezcla de amplificación de PCR.
5. Colocar los tubos en el rack del termociclador y seleccionar el número de ciclos térmicos deseados.
6. Después de terminar el protocolo de ciclos térmicos, almacenar las muestras a -20° C en una caja que las proteja de la luz.
7. Preparar una mezcla de carga para el equipo de EC ABI PRISM® 310, mediante la combinación del Internal Lane Standard 600 (ILS 600) y la Hi-Di™ formamida de la siguiente manera:
$$[(1.0\mu\text{l ILS 600}) \times (\# \text{inyecciones})] + [(24.0\mu\text{l Hi-Di}^{\text{TM}} \text{ formamida}) \times (\# \text{inyecciones})]$$
8. Mezclar por 10-15 segundos en el agitador.
9. Combinar 25.0µl de la mezcla de descarga preparada y 1.0 µl de la muestra amplificada.
10. Combinar 25.0 µl de la mezcla de descarga preparada y 1.0 µl del PowerPlex® 16 HS Allelic Ladder Mix.
11. Centrifugar los tubos brevemente para eliminar las burbujas de aire de los pozos, si es necesario.
12. Desnaturalizar las muestras y la escalera alélica sometiéndolas a 95° C durante 3 minutos e inmediatamente enfriar en baño de hielo durante 3 minutos. Las muestras deben desnaturalizarse justo antes de la carga.
13. Montar los tubos en la bandeja de muestras del instrumento ABI PRISM® 310.
14. Seleccione el tiempo de inyección y el tiempo de ejecución, seleccionar “Ejecutar” para iniciar el sistema de electroforesis capilar.
15. Finalmente se lleva a cabo la interpretación de los resultados.

3.4.2 Análisis de las muestras empleadas para el estudio de validación.

- **Análisis del umbral utilizando un blanco de agua:**

1. Montar y amplificar en el GeneAmp[®] PCR System 9700, un blanco de agua grado amplificación, usando parámetros de 32 ciclos (10/22)
2. Inyectar los blancos a 1, 3, 5 y 7 segundos en el instrumento de EC, ABI PRISM[®] 310 Gene Analyzer, utilizando análisis de 1 RFU.
3. Analizar 4 veces más para un total de 5 repeticiones.

- **Determinación de la Sensibilidad.**

1. Muestras del estándar interno 9947A ADN que contengan 0.5 y 1.0 ng.
2. Amplificar por separado en el GeneAmp[®] PCR System 9700 a 32 (10/22), 30(10/20), 28 (10/18) y 26 (10/16) ciclos.
3. Inyectar durante 3 segundos las muestras en el instrumento de EC, ABI PRISM[®] 310 Gene Analyzer.
4. Repetir 3 veces cada concentración para cada ciclo.

- **Determinación del Rango dinámico, Umbral estocástico, Precisión y Reproducibilidad.**

1. Utilizar 7 muestras del estándar interno 9947A ADN que contengan 0.03, 0.05, 0.025, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 ng.
2. Amplificar por separado en el GeneAmp[®] PCR System 9700 a 28 ciclos (10/18)
3. Inyectar durante 3 segundos las muestras en el instrumento de EC, ABI PRISM[®] 310 Gene Analyzer.
4. Analizar cada muestra 4 veces más para obtener un total de 21 muestras.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

José Ortega y Gasset

4.1 RESULTADOS.

En este capítulo se presentan los resultados que se obtuvieron en nuestro estudio de investigación, ahora que contamos con el conocimiento teórico expuesto en el capítulo II sobre la tipificación de los STRs e interferencias que pueden presentarse, podemos analizar los datos de una manera eficiente. Los parámetros que la guía de Promega indica que se calculen son principalmente las interferencias que aparecen en los electroferogramas los cuales pueden complicar la interpretación de los resultados.

Se muestran las tablas de datos obtenidos a partir de las medias de las repeticiones con sus desviaciones estándar, posteriormente se presentan las gráficas correspondientes a cada tabla en las que se observa mejor el comportamiento que presentan los datos a las diferentes concentraciones.

La discusión se hará con base en los artículos consultados e investigaciones recientes, los cuales nos servirán de referencia para comparar si lo obtenido cumple con lo establecido en la bibliografía y lo más importante, para determinar si nuestro estudio cumple con los objetivos establecidos en el capítulo I y a su vez con la hipótesis planteada.

4.2 RESULTADOS OBTENIDOS.

A continuación se muestran los datos obtenidos con el blanco y el control positivo de ADN 9947A, la información se estructura en tablas. Cada parámetro calculado especifica lo que debe de cumplirse de acuerdo a la guía de Promega.

4.2.1 Análisis del umbral.

Una vez que se obtuvieron las medias y las desviaciones estándar de las repeticiones para cada uno de los tiempos de inyección, se construyeron dos tablas con estos datos para posteriormente realizar el cálculo del límite de detección.

Tabla 3. Resultados de las medias obtenidas en las repeticiones para cada tiempo de inyección. En la parte inferior se muestra el promedio.

Marcadores	μ de las alturas de las repeticiones (RFU)			
	1 s	3 s	5 s	7 s
D3S1358	10.6002835	11.1707002	11.174976	10.3619658
TH01	10.2283842	10.5764171	10.3414176	9.73232601
D21S11	10.1148153	10.4638177	10.4342065	10.2088663
D18S51	9.88921701	10.5420693	10.2623507	10.0766303
Penta E	9.86117691	10.3620753	10.2621642	10.1303531
D5S818	14.2587125	15.2350766	15.0491124	14.4454392
D13S317	15.5230353	16.0978953	15.1652928	14.86
D7S820	14.934447	14.9227437	15.1089269	14.0879426
D16S539	14.0632821	15.1028356	14.4871929	15.32711
CSF1PO	14.5094865	15.0511809	15.0972804	14.7451967
Penta D	14.8773356	14.1191478	15.4378137	14.4648586
AMEL	7.16	7.4547619	8.88642857	7.57333333
vWA	7.96754917	8.62364818	8.28765174	9.28399118
D8S1179	7.89542484	8.77715668	8.27075236	9.19637651
TPOX	7.48298003	8.14190598	8.91988009	8.79681868
FGA	7.50128257	7.90269574	7.94078475	8.21897049
Promedio	11.0542133	11.534008	11.5703895	11.3443862

Tabla 4. Desviaciones estándar obtenidas de los datos correspondientes a la Tabla 2. En la parte inferior se muestra el promedio.

Marcadores	σ de los resultados obtenidos en las repeticiones			
	1 s	3 s	5 s	7 s
D3S1358	0.91221573	0.85753844	0.59376422	0.56375585
TH01	0.62764977	0.92086875	0.52904129	1.00716551
D21S11	0.39875616	0.68863527	0.47772429	0.53392094
D18S51	0.28940099	0.37747239	0.36235243	0.62702068
Penta E	0.59449477	0.34542597	0.25080627	0.85267064
D5S818	0.98260043	1.17074418	0.75803183	1.12930278
D13S317	1.61072601	0.53964768	1.25094523	1.69960176
D7S820	0.92736252	0.83815222	0.87368655	0.95691442
D16S539	0.73751458	0.9962602	1.20302333	1.50389047
CSF1PO	1.54689199	1.23377012	0.76108929	0.92445285
Penta D	0.67060301	0.19792627	0.94414157	0.33252681
AMEL	0.86628458	0.56809544	1.52553186	0.82778151
vWA	0.76547518	0.51720931	0.5104645	0.16834869
D8S1179	0.54683291	0.57581315	0.41579847	0.51919389
TPOX	0.22372881	0.7347792	0.519746	0.38962889
FGA	0.41536749	0.16298455	0.41036455	0.56934305
Promedio	0.75724406	0.6703327	0.71165698	0.78784492

4.2.1.1 Cálculo del límite de detección.

Teniendo los datos correspondientes a las medias y desviaciones estándar para cada tiempo de inyección, podemos obtener el LD para cada tiempo. A continuación se muestra la fórmula del LD:

$$LD = \mu + 3\sigma + [\text{Ecuación 1}]$$

- Inyección 1 s

$$LD = 11.0542133 + [(3) (0.75724406)]$$

$$LD = 13.3259455 \text{ RFU}$$

- Inyección 3 s

$$LD = 11.534008 + [(3) (0.6703327)]$$

$$LD = 13.5450061 \text{ RFU}$$

- Inyección 5 s

$$LD = 11.5703895 + [(3) (0.71165698)]$$

$$LD = 13.70536041 \text{ RFU}$$

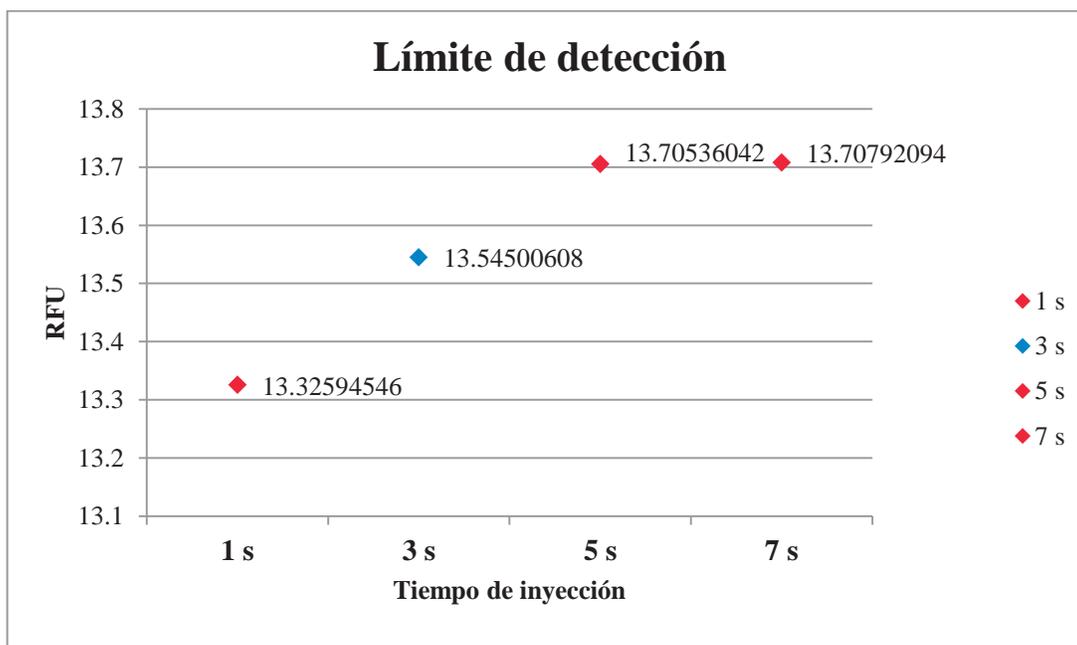
- Inyección 5 s

$$LD = 11.3443862 + [(3) (0.78784492)]$$

$$LD = 13.7079209 \text{ RFU}$$

Tabla 5. Valor del LD para cada tiempo de inyección

Tiempo de inyección	μ	σ	LD (RFU)
1 s	11.0542133	0.75724406	13.3259455
3 s	11.534008	0.6703327	13.5450061
5 s	11.5703895	0.71165698	13.7053604
7 s	11.3443862	0.78784492	13.7079209



Gráfica 1. Gráfica que representa el LD para cada tiempo de inyección.

4.2.2 Sensibilidad.

Se hizo una modificación a lo que la guía establece, se utilizaron las concentraciones de 0.5 ng y 1.0 ng y se analizó el control positivo de ADN 9947 A a 26, 28, 30 y 32 ciclos en el termociclador.

Perfil al 100% = 16 marcadores

4.2.2.1 Perfil completo.

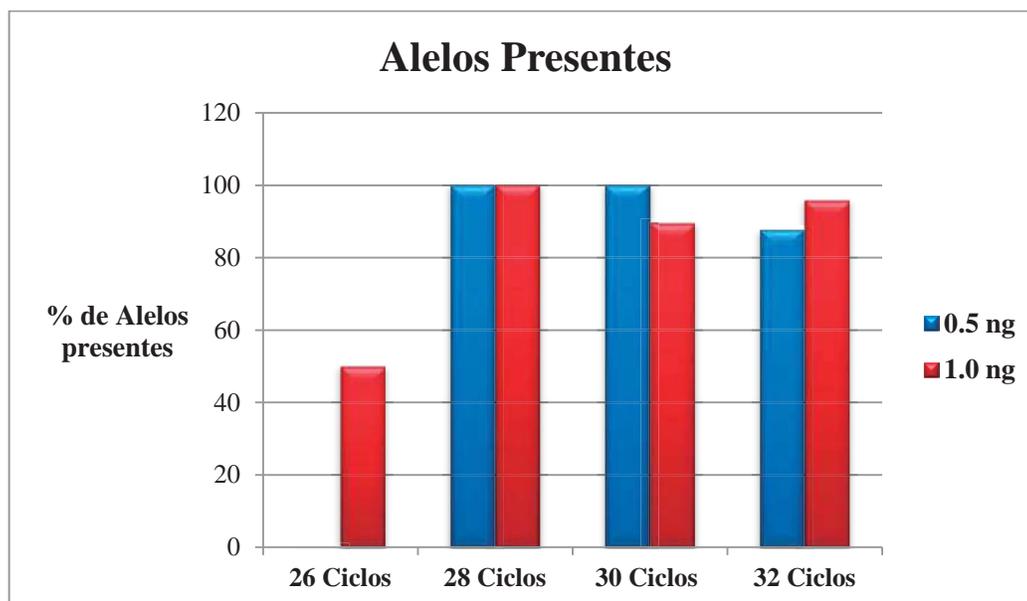
Un perfil completo es el 100% que equivale a los 16 alelos que se analizan con el kit. Se numeraron los alelos presentes en cada una de las mediciones sometidas a los diferentes ciclos y a las dos concentraciones. Los resultados obtenidos fueron:

Tabla 6. Porcentaje de alelos obtenidos para la concentración 0.5 ng.

Repetición	Ciclo 26	Ciclo 28	Ciclo 30	Ciclo 32
1	0	100	100	87.5
2	0	100	100	75
3	0	100	100	100
Promedio %	0	100	100	87.5

Tabla 7. Porcentaje de alelos obtenidos para la concentración 1.0 ng.

Repetición	Ciclo 26	Ciclo 28	Ciclo 30	Ciclo 32
1	56.25	100	93.75	93.75
2	56.25	100	87.5	100
3	37.5	100	87.5	93.75
Promedio %	50	100	89.58333333	95.83333333



Gráfica 2. Porcentaje de alelos presentes para cada concentración.

4.2.2.2 Número de stutters observados.

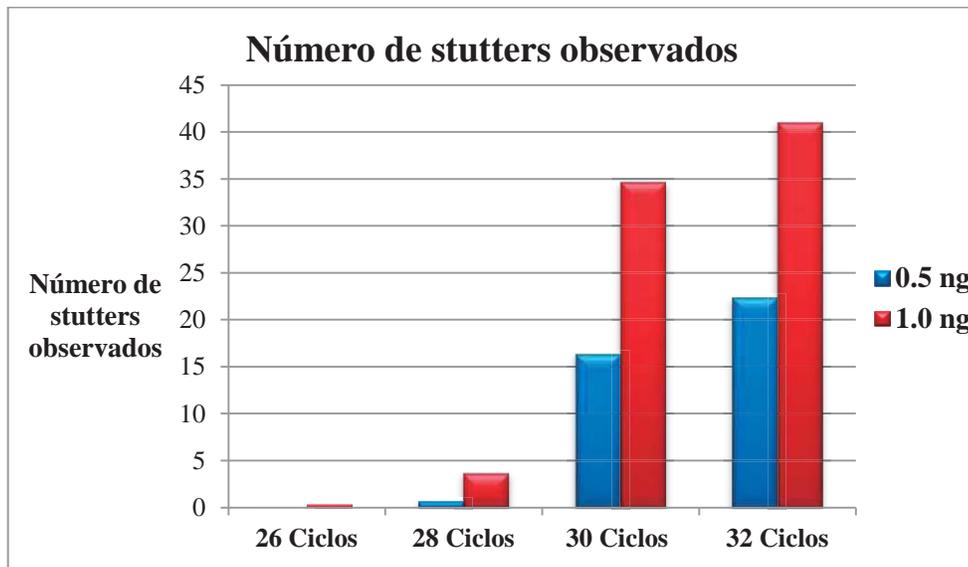
Para identificar los productos *stutter* presentes en los resultados se tomaron en cuenta las características mencionadas en el capítulo II en el marco referencial. Generalmente se localizan a -4 pb de un alelo real, además la altura que presentan es menor que los alelos verdaderos. De igual forma se contaron y posteriormente se graficaron ambas concentraciones. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8. Número de stutter observados en la concentración de 0.5 ng.

Repetición	Ciclo 26	Ciclo 28	Ciclo 30	Ciclo 32
1	0	0	17	22
2	0	2	17	23
3	0	0	15	22
Promedio	0	0.66666667	16.33333333	22.33333333

Tabla 9. Número de stutter observados en la concentración de 1.0 ng.

Repetición	Ciclo 26	Ciclo 28	Ciclo 30	Ciclo 32
1	1	7	33	38
2	0	2	32	45
3	0	2	39	40
Promedio	0.33333333	3.66666667	34.66666667	41



Gráfica 3. Número de stutters observados para cada concentración.

4.2.3. Rango dinámico.

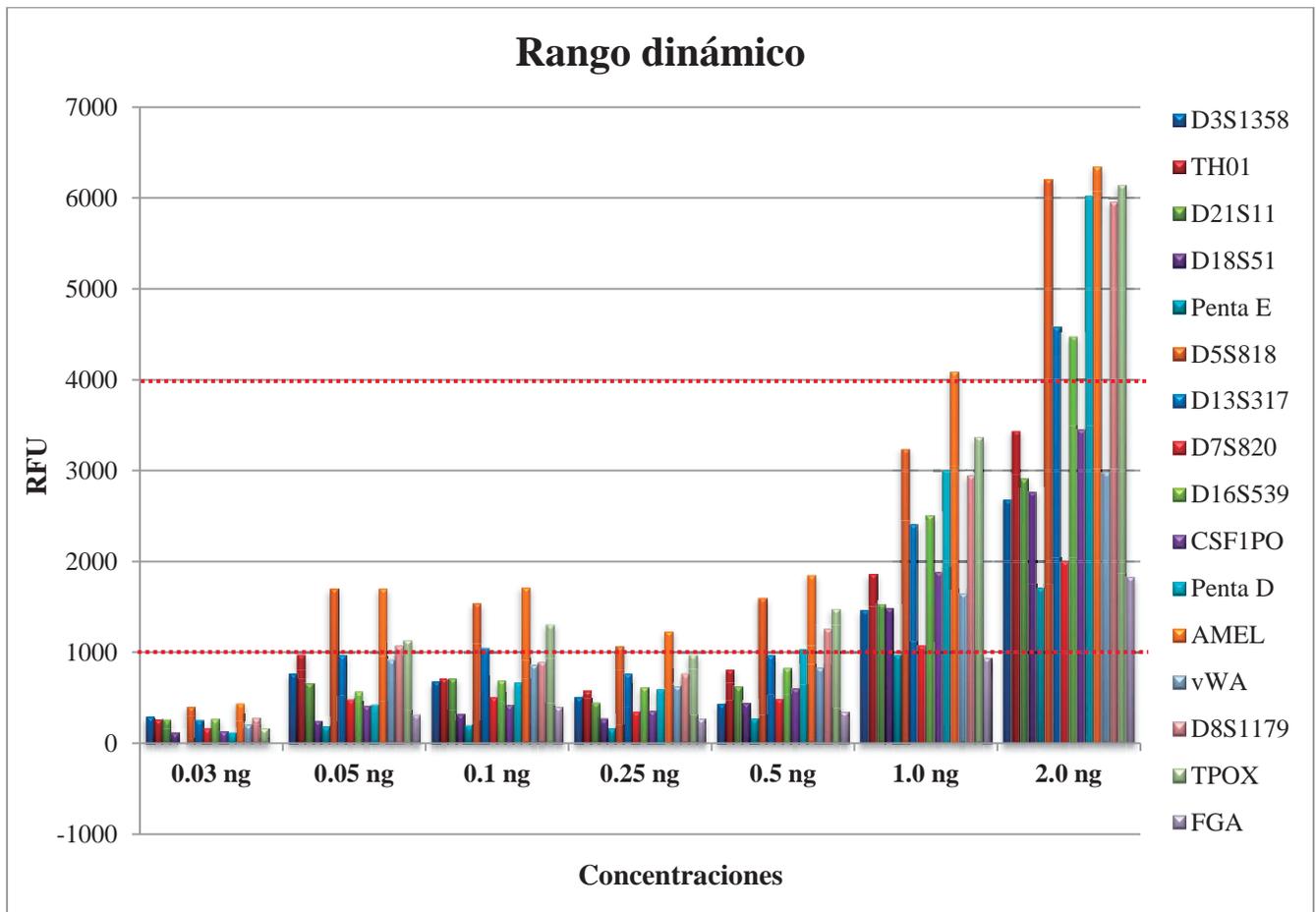
El rango dinámico muestra la menor y mayor concentración de ADN que puede ser detectada por el equipo con altura ideal de los picos y con un perfil completo.

Altura ideal de los picos es de 1000 - 4000 RFU.

Perfil al 100% = 16 marcadores

Tabla 10. Medias de las alturas (RFU) de las repeticiones para los 16 marcadores del kit a las diferentes concentraciones. Los valores marcados con en color azul son los alelos que no cumplen con el parámetro establecido.

Marcador	Altura de los picos para cada concentración (RFU)						
	0.03 ng	0.05 ng	0.1 ng	0.25 ng	0.5 ng	1.0 ng	2.0 ng
D3S1358	286	761.625	675.8	503.875	431	1458.66667	2680.5
TH01	256.75	972.625	705.2	578.5	804.75	1853.83333	3431.875
D21S11	263	659.5	714.2	448.5	622.25	1533	2907.75
D18S51	112.5	243.75	317.1	271.125	439.5	1487	2767.375
Penta E	0	186.166667	199.9	162.5	266.25	966.666667	1703.75
D5S818	394	1699	1536	1060	1593.75	3235	6203
D13S317	250.666667	964.25	1048.2	764.75	963.5	2404.33333	4583
D7S820	163.5	478.875	507.7	347.625	487.375	1070	1999.5
D16S539	265.24	565.125	691.1	608	822.875	2501.6666	4475.125
CSF1PO	130.833333	410.75	412.6	350.375	600.75	1885.1666	3449
Penta D	118.666667	418.5	660.8	597	1028	3001.6666	6026.5
AMEL	439.25	1697.25	1715.6	1228.5	1850.25	4082.6666	6339
vWA	203.375	911.75	865.4	627.875	826	1646.33333	2977.125
D8S1179	279	1072.75	890.2	768.5	1255	2942	5956.5
TPOX	162	1126.5	1304	972.75	1475	3364	6139
FGA	0	314.66666	394.7	264	341	941.33333	1827.875



Gráfica 4. Rango Dinámico mostrando la altura de los picos (RFU) de los 16 marcadores correspondientes al kit. Las líneas rojas indican el intervalo de altura ideal de los picos.

4.2.4 Umbral Estocástico.

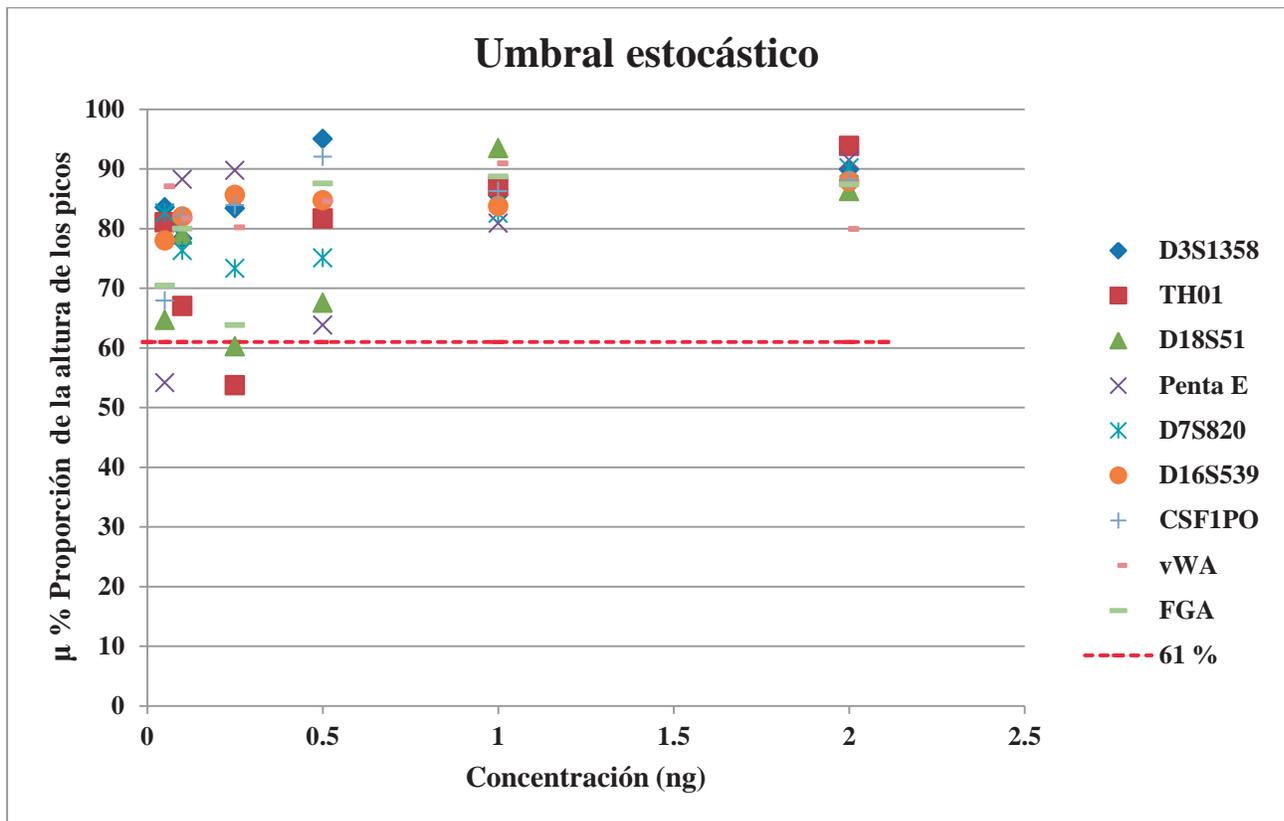
El análisis del Umbral Estocástico muestra el imbalance que presentan los alelos de los picos heterocigotos, tenemos 9 alelos heterocigotos para el control positivo de ADN 9947A utilizado. Se calculó el % *proporción* de la altura de los picos y se graficó contra las diferentes concentraciones. Los datos correspondientes a la concentración de 0.03 ng se excluyeron de este parámetro debido a que los valores que se obtuvieron son muy pocos y no son representativos por lo que es imposible trabajar la estadística descriptiva que se aplicó a los demás. Se debe cumplir lo siguiente:

% Proporción debe ser mayor a 61%

La guía no indica cómo debe de calcularse % *proporción*, así que se investigó en estudios ya realizados para obtener la ecuación 2 que se muestra en el Marco Histórico. Una vez calculados los % Ratio se obtuvo la siguiente información.

Tabla 11. Media del % proporción de los picos heterocigotos de las repeticiones calculada en cada concentración para los 9 alelos heterocigotos del estándar interno. Los valores marcados con en color azul son los alelos que no cumplen con el parámetro establecido

Marcador heterocigoto	μ % Ratio					
	0.05 ng	0.1 ng	0.25 ng	0.5 ng	1.0 ng	2.0 ng
D3S1358	83.5389557	78.3344921	83.3829393	94.9866041	85.5415546	89.9041295
TH01	81.0211133	67.0150924	53.7163315	81.7055164	87.1416055	93.8134299
D18S51	64.6743031	78.9703877	60.2476545	67.5293144	93.4519922	86.2831749
Penta E	54.1753292	88.2367752	89.7142857	63.8109782	80.8557096	91.4708138
D7S820	82.5696242	76.2840822	73.3193568	75.0645345	82.5364537	90.1855077
D16S539	77.9997968	82.0215421	85.6511021	84.697749	83.7739116	87.9130463
CSF1PO	67.9038153	82.0668212	83.9440928	92.0230907	86.2578195	88.1288456
vWA	87.071726	81.6596564	80.201689	84.5841535	90.8984497	79.8989958
FGA	70.4240251	79.959319	63.8367847	87.5695294	88.7132197	87.3686309



Gráfica 5. Porcentaje de *Ratio* para los marcadores heterocigotos. En esta gráfica se observa que a bajas concentraciones de AND algunos marcadores están por debajo del % Ratio considerado como ideal.

4.2.5 Precisión y Reproducibilidad.

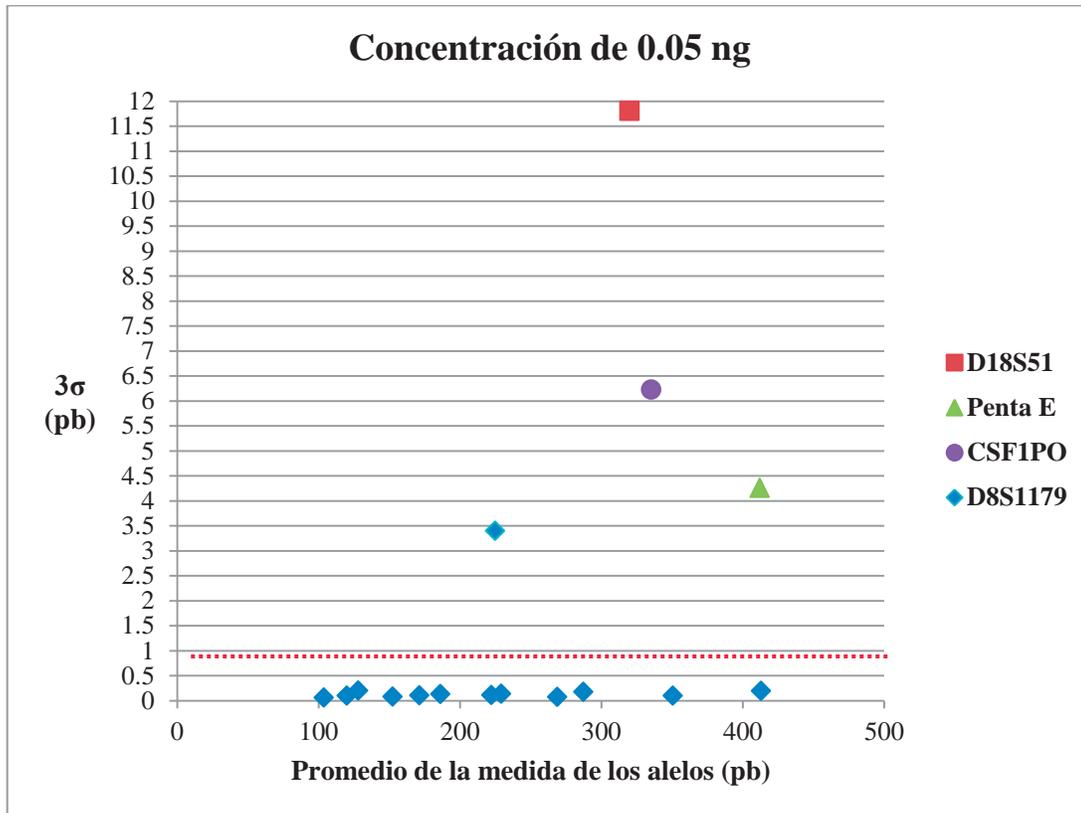
Para obtener la precisión y reproducibilidad utilizamos la medida de los alelos en pb. Como se mencionó en el parámetro anterior, también se excluyó de éste la concentración de 0.03 ng debido a que los valores que se obtuvieron son muy pocos y no son representativos. Se calculó el promedio (media) y la desviación estándar para observar si se cumple con lo siguiente:

3σ del promedio de la medida de los alelos debe ser menor que 0.5 pb.

- Concentración de 0.05 ng se obtuvo:

Tabla 12. Resultados obtenidos en la concentración de 0.05 ng, repetibilidad y reproducibilidad. Los valores marcados con en color azul son los alelos que no cumplen con el parámetro establecido.

Marcadores	Promedio de las repeticiones	3σ
D3S1358	119.96	0.09526279
TH01	171.27	0.10024969
D21S11	222.1975	0.10781929
D18S51	319.86625	11.8075148
Penta E	412.065	4.25791322
D5S818	128.13	0.20049938
D13S317	186.22	0.12961481
D7S820	229.055	0.13802174
D16S539	287.15125	0.17379945
CSF1PO	335.3025	6.22575899
Penta D	412.9125	0.19189841
AMEL	103.655	0.05744563
vWA	152.33375	0.08066133
D8S1179	224.765	3.3950405
TPOX	268.6875	0.07088723
FGA	350.636667	0.09987492

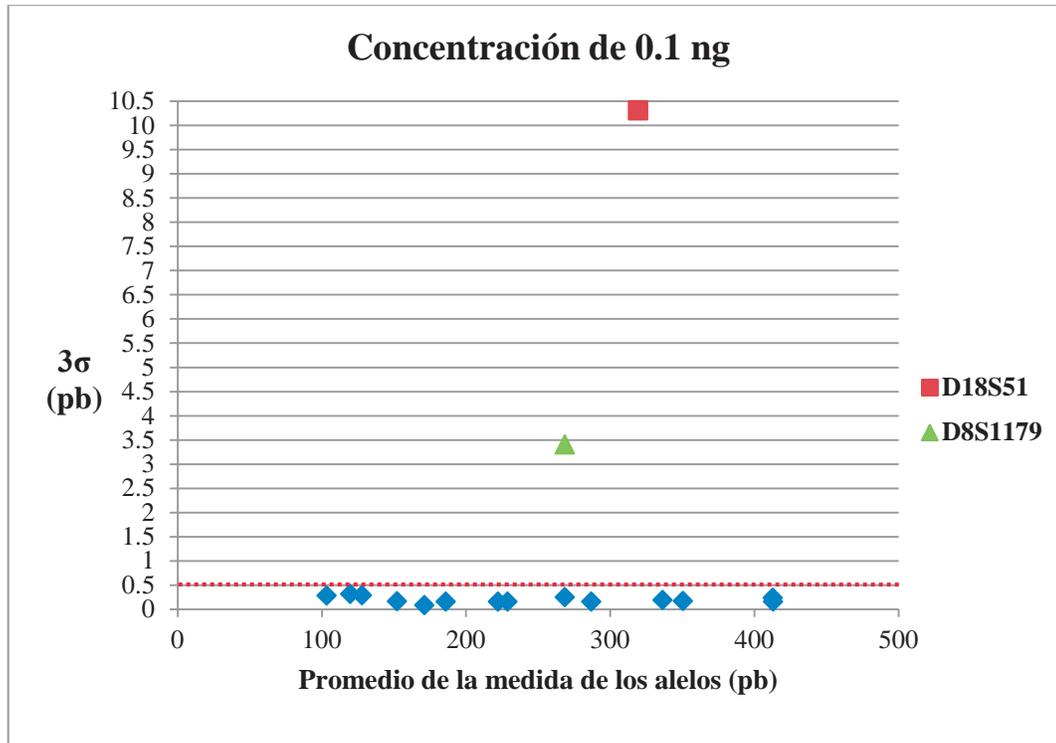


Gráfica 6. Promedio de la medida de los alelos en las repeticiones en la concentración de 0.05 ng. Los alelos que presentan una desviación estándar grande son los que se salen del parámetro establecido de 0.5 pb, en la gráfica se observa como uno de los valores asciende hasta 11 pb.

- Concentración de 0.1 ng se obtuvo:

Tabla 13. Resultados obtenidos en la concentración de 0.1 ng, repetibilidad y reproducibilidad. Los valores marcados con azul son los alelos que no cumplen con el parámetro establecido, esta concentración solo dos sobrepasan 0.5 pb.

Marcadores	Promedio de las repeticiones	3 σ
D3S1358	119.841	0.31111895
TH01	171.24	0.08147085
D21S11	222.224	0.15089732
D18S51	319.567	10.3068153
Penta E	413.061	0.15421576
D5S818	128.022	0.28254203
D13S317	186.156	0.15089732
D7S820	228.999	0.1493988
D16S539	286.981	0.1493988
CSF1PO	336.436	0.18444511
Penta D	412.954	0.22906331
AMEL	103.512	0.27609781
vWA	152.278	0.15860328
D8S1179	224.498	3.4034567
TPOX	268.752	0.24409015
FGA	350.58	0.16635805

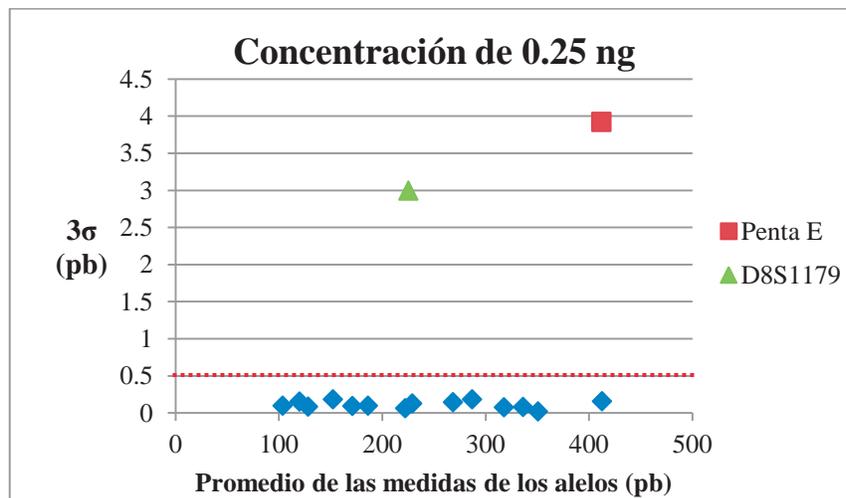


Gráfica 7. Promedio de la medida de los alelos en las repeticiones en la concentración de 0.1 ng. Se observa que dos marcadores presentan una desviación mayor.

- Concentración de 0.25 ng se obtuvo:

Tabla 14. Resultados obtenidos en la concentración de 0.25 ng, repetibilidad y reproducibilidad. Al igual que en la concentración anterior, dos marcadores sobrepasan 0.5 pb, repitiéndose el D8S1179.

Marcadores	Promedio de las repeticiones	3σ
D3S1358	120.01125	0.15266385
TH01	171.285	0.09565563
D21S11	222.19	0.06480741
D18S51	317.9125	0.07794229
Penta E	412.19	3.92276051
D5S818	128.23	0.08485281
D13S317	186.23	0.09797959
D7S820	229.0875	0.12816006
D16S539	287.14125	0.18263693
CSF1PO	336.35375	0.0825
Penta D	412.91	0.15684387
AMEL	103.675	0.09949874
vWA	152.38	0.18165902
D8S1179	225.30125	2.99520554
TPOX	268.665	0.14387495
FGA	350.755	0.0212132

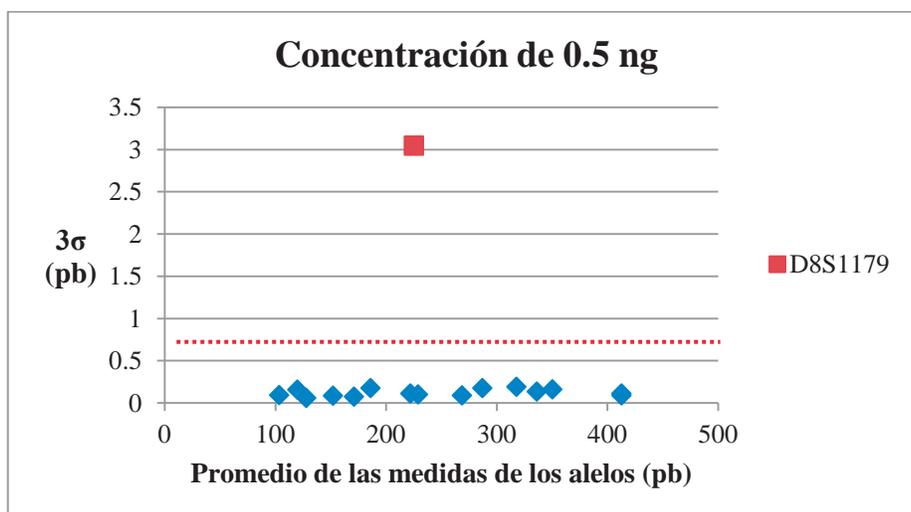


Gráfica 8. Promedio de la medida de los alelos en las repeticiones en la concentración de 0.5 ng. Dos alelos no cumplen pero disminuyó el valor de 3σ para los que salen del valor permitido.

- Concentración de 0.5 ng se obtuvo:

Tabla 15. Resultados obtenidos en la concentración de 0.5 ng, repetibilidad y reproducibilidad. En la tabla se observa que ahora que la concentración es mayor, 0.5 ng, solo el alelo marcado con azul, D8S1179, sale de lo establecido.

Marcadores	Promedio de las repeticiones	3σ
D3S1358	119.925	0.15684387
TH01	171.295	0.07449832
D21S11	222.195	0.11090537
D18S51	317.93625	0.19067315
Penta E	412.94625	0.11115867
D5S818	128.155	0.05744563
D13S317	186.2025	0.17727098
D7S820	229.05125	0.10052985
D16S539	287.09625	0.17379945
CSF1PO	336.3575	0.1344433
Penta D	412.9275	0.08958236
AMEL	103.615	0.09327379
vWA	152.34125	0.08518363
D8S1179	225.27625	3.04588349
TPOX	268.7125	0.08958236
FGA	350.64875	0.16172894

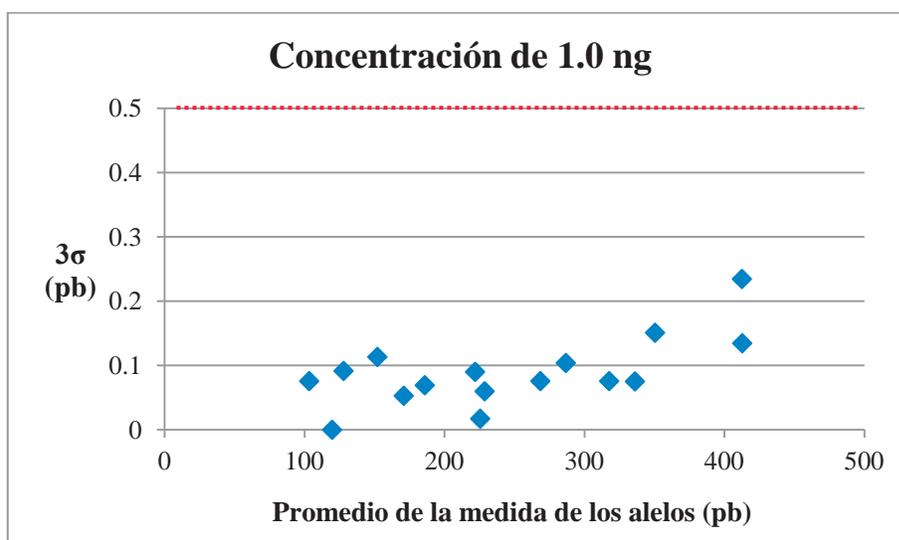


Gráfica 9. Promedio de la medida de los alelos en las repeticiones en la concentración de 0.5 ng. El marcador que no cumple es el D8S1179, mismo que apareció en la concentración de 0.25 ng.

- Concentración de 1.0 ng se obtuvo:

Tabla 16. Resultados obtenidos en la concentración de 1.0 ng repetibilidad y reproducibilidad. Se observa que es la concentración que cumple perfectamente con el parámetro establecido porque todos los alelos están debajo de 0.5 pb.

Marcadores	Promedio de las repeticiones	3σ
D3S1358	119.93	0
TH01	171.276667	0.05267827
D21S11	222.25	0.09
D18S51	317.958333	0.07549834
Penta E	413.018333	0.1344433
D5S818	128.083333	0.09165151
D13S317	186.156667	0.06928203
D7S820	229.015	0.06
D16S539	287.06	0.10392305
CSF1PO	336.405	0.075
Penta D	412.91	0.23430749
AMEL	103.553333	0.07549834
vWA	152.335	0.11324752
D8S1179	225.773333	0.01732051
TPOX	268.753333	0.07549834
FGA	350.633333	0.15099669

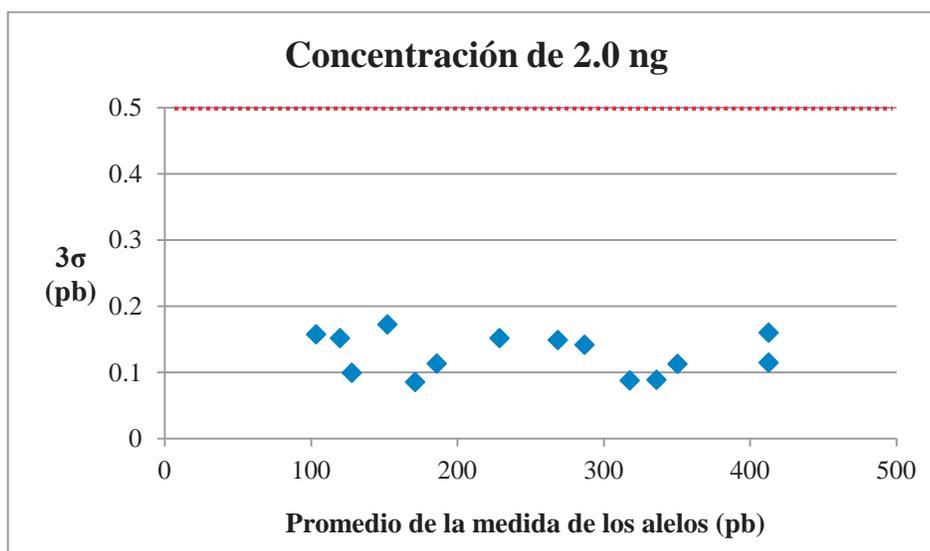


Gráfica 10. Promedio de la medida de los alelos en las repeticiones en la concentración de 1.0 ng. Todos los alelos dentro del parámetro establecido.

- Concentración de 2.0 ng se obtuvo:

Tabla 17. Resultados obtenidos en la concentración de 2.0 ng repetibilidad y reproducibilidad. También esta concentración cumple con el parámetro ya que todos los alelos están debajo de 0.5 pb.

Marcadores	Promedio de las repeticiones	3σ
D3S1358	119.895	0.15149257
TH01	171.2275	0.08529361
D21S11	223.57125	2.67003862
D18S51	317.97875	0.08778525
Penta E	412.95375	0.11448253
D5S818	128.0925	0.09912114
D13S317	186.1875	0.11324752
D7S820	228.995	0.15149257
D16S539	287.03125	0.14144345
CSF1PO	336.39375	0.08863549
Penta D	412.875	0.15968719
AMEL	103.5575	0.15755951
vWA	152.3025	0.17211914
D8S1179	226.71625	3.43687449
TPOX	268.75	0.14899664
FGA	350.61	0.1129159



Gráfica 11. Promedio de la medida de los alelos en las repeticiones en la concentración de 2.0 ng. Se observa que a mayor concentración los datos están menos desviados.

4.3 DISCUSIÓN.

De acuerdo a los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros calculados podemos decir que:

- La guía de Promega indica que en el análisis del umbral se debe determinar el **ruido** producido en la línea base del electroferograma utilizando el blanco [48]. Analizando la Gráfica 1. del LD podemos observar que las condiciones de inyección más adecuadas son a 3 segundos porque el LD es menor y por lo tanto hay una menor producción de ruido en la línea base, lo cual indica que a más tiempo de inyección hay mayor ruido; se observa que el tiempo que menor ruido produce es el de 1 segundo, sin embargo no lo consideramos adecuado porque puede resultar insuficiente tiempo para que la cantidad de muestra necesitaría se inyecte en el equipo produciendo bajas alturas en los picos. De acuerdo a lo anterior determinamos que cuando se inyecte una muestra a este tiempo y el electroferograma muestre bajas alturas en los picos de los alelos, se tendrá la certeza que hay poca producción de ruido y que difícilmente se confundirán los picos.

- La Sensibilidad fue útil para determinar el número de ciclos más adecuado para procesar las muestras de acuerdo a la concentración que presente la muestra, identificando que:

- A una concentración de 0.5 ng y bajo número de ciclos (26), no se obtiene el perfil completo. La baja concentración de ADN y los pocos ciclos que tuvo la ADN polimerasa no fueron suficientes para lograr hacer las replicas de los STRs y por ello no se obtuvo el perfil genético, Gráfica 2, esto concuerda con el estudio realizado por Jason R. Gilder y Co., “Variación magnitud-dependencia en el balance de la altura de los picos de los STR heterocigotos”, en el que observaron que la baja concentración puede afectar hasta el punto en que el alelo no se detecta [58].

- Se observó que a menor número de ciclos el perfil es completo y el número de **stutters** es muy bajo, esto se observa claramente en la Gráfica 3, lo cual indica que debido a que hay pocos ciclos de amplificación en la PCR, la ADN polimerasa tiene pocas oportunidades para deslizarse y producir los picos stutter. Lo anterior lo explica uno de los principales investigadores de los STRs, el Dr. Butler en su libro “Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers” así como el estudio realizado por Benoît Leclair y

Co., “Análisis sistemático de los porcentajes de stutter, altura de los picos de los alelos y los relación de las áreas de los STR heterocigotos en casos forenses de trabajo y muestras de bases de datos” [33,59].

- A mayor número de ciclos los perfiles comienzan a ser incompletos y con un mayor número de *stutters*, esto se observa en la Gráfica 3, contrario a lo que se mencionó anteriormente, la polimerasa tiene mayores oportunidades para deslizarse y producir stutters.
- En el Rango dinámico determinamos la altura ideal de los picos, de acuerdo a la guía de Promega está entre 1000 y 4000 RFU. Como se observa en la Gráfica 4, las concentraciones que alcanzan esta altura son las de 1.0 y 2.0 ng. Se observa que a menor concentración la altura de los picos disminuye considerablemente. Los perfiles obtenidos fueron completos a excepción de la concentración de 0.03 ng.
- El umbral estocástico en general presentó buenos resultados porque los alelos heterocigotos presentan un % *Proporción* mayor al establecido en la guía de Promega que es de 61%, esto significa que los picos se encuentran bien balanceados. La Gráfica 5 muestra que las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 ng, tienen un excelente balance en los picos ya que los % de las *proporciones* están muy cercanos al 100%. Las concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.25 ng presentan imbalance en los marcadores Penta E, TH01, D18S51, FGA y D7S820. Jason R. Gilder y Co., así como Benoît Leclair y Co., en sus estudios ya mencionados, encontraron que el imbalance de los picos se debe principalmente a dos factores que son: mezclas de ADN y la concentración, en este caso no podemos considerar que se deba a mezclas porque no trabajamos con muestras reales, se utilizó un control positivo de ADN; por lo tanto se considera que se debe a que las concentraciones de ADN son muy bajas [49, 58-59], lo cual se observa claramente en la Gráfica 5 conforme la concentración disminuye se presenta mayor imbalance en los picos.
- La determinación de los promedios de las medidas de los alelos es importante porque nos indica el grado de desviación del alelo analizado respecto al de la escalera alélica, si los alelos salen del parámetro establecido, pueden provocar interferencias en la tipificación de los STRs en el electroferograma. Si se calculan 3σ de las repeticiones y un alelo sale de 0.5 pb, puede

impedir que la escalera alélica lo identifique y etiquete, produciendo un “*off-ladder*”, además puede confundirse con un stutter, artefacto, entre otros fenómenos de interferencia estudiados por el Dr. Butler, mencionados en el capítulo II [33]. Las de Gráficas 6, 7, 8 y 9 muestran que Penta E, D18S51 y D8S1179 salen de esta especificación cuando las concentraciones son bajas, mientras que en las concentraciones de 1.0 ng y 2.0 ng en las Gráficas 10 y 11, los valores de 3σ están por debajo de 0.3 pb y 0.2 pb, respectivamente.

De acuerdo a lo anterior discutido observados que la causa fundamental de interferencias en la tipificación de los STRs se debe primordialmente a las bajas concentraciones de ADN.

En este capítulo se interpretaron los resultados obtenidos en nuestro estudio de validación interna haciendo una relación con los estudios ya realizados y se observó que se concuerda en que las concentraciones bajas producen perfiles genéticos incompletos y de poca calidad al presentar alto nivel de interferencias. Una vez que se tiene la interpretación y discusión de los datos podemos finalmente plantear nuestra conclusión y dar una visión del trabajo a futuro que puede desprenderse de la validación realizada con el kit PowerPlex[®] 16 HS, utilizando el control positivo de ADN.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO.

*"Si he conseguido ver más lejos, es porque
me he aupado en hombros de gigantes"*

Isaac Newton

5.1 IMPORTANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Actualmente el estudio del ADN es un tema de gran interés para la humanidad, puesto que día con día se han obtenido grandes beneficios en diferentes áreas de la salud, investigación y criminalística. Esta última se ha convertido en una herramienta indispensable para los laboratorios forenses por la gran capacidad que tiene la prueba genética para identificar a las personas, ya que los resultados que se obtienen son totalmente confiables porque es prácticamente imposible que dos personas, a excepción de los gemelos, posean el mismo perfil genético.

Con este capítulo llegamos a la parte final de nuestro estudio de investigación pues es aquí donde concluimos nuestro trabajo y mencionamos de manera concreta las aportaciones que se lograron con la validación interna del kit PowerPlex[®] 16 HS para la tipificación de los STRs, si se cumplieron los objetivos y lo más importante si cumplimos con la hipótesis planteada en el capítulo I.

La validación interna del kit PowerPlex[®] 16 HS realizada con el control positivo de ADN nos proporcionó información muy importante sobre el comportamiento que tienen los equipos y reactivos al someterlos a diferentes condiciones de trabajo y concentraciones, además cumplimos con los principales puntos de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 relacionados con la validación de los métodos, con la validación interna de este método se contribuyó a la acreditación del Laboratorio Forense de la PGJE, siendo el primer laboratorio en esta área que logra este prestigio en México y en América Latina [61].

El estudio de validación realizado nos orienta para seguir investigando en nuevos proyectos que pueden aportar más conocimiento para que la tipificación de los STRs cada vez sea mejor y de mayor calidad. Por lo anterior expuesto, finalizamos mencionando los trabajos que se pueden derivar de este para complementar información obtenida.

5.2 CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en del estudio de validación interna para el kit utilizando el control positivo de ADN, determinamos que las condiciones ideales para el análisis de las muestras en la obtención del perfil genético son:

- Concentración de 1.0 ng de ADN;
- Ciclos en el termociclador de 28 (10/18);
- Inyección de la muestra en el equipo de EC de 3 segundos.

Estas condiciones son las más adecuadas porque con ellas obtenemos:

- Menor producción de *ruido* en la línea base del electroferograma.
- Un *perfil completo* con todos los alelos del kit presentes;
- Alturas de los picos entre *1000-4000 RFU*;
- La proporción de altura de los picos heterocigotos es muy buena, *% Proporción* cercano a 100;
- Las *medidas de los alelos* no presentan desviaciones significativas;
- El número de productos *stutter* es bajo y son fáciles de identificar.

Debido a que no siempre es posible obtener una muestra de 1.0 ng de ADN, una vez que se obtiene la concentración se decidirá, de acuerdo al estudio de validación realizado, si se somete a mayor número de ciclos o si se inyecta más tiempo, etc., con la finalidad de obtener un mejor resultado.

Finalizamos mencionando que la hipótesis planteada en el capítulo inicial se cumplió satisfactoriamente porque el estudio de validación interna utilizando el kit comercial PowerPlex® 16 HS y el control positivo de ADN 9947A, nos permitieron establecer los parámetros de trabajo más adecuados con los se procesarán las muestras en el laboratorio de acuerdo a las características que estas presenten.

5.3 TRABAJO A FUTURO.

Con el presente estudio se establecieron las condiciones de trabajo más adecuadas para la tipificación de los STRs utilizando el kit PowerPlex[®] 16 HS, sin embargo la investigación relacionada a la validación en el área de Genética Forense de los laboratorios de la PGJE, puede continuar realizando estudios posteriores, tales como:

- Validación de los kits empleados para PCR en tiempo real, en la cual el ADN se cuantifica y analiza en el mismo equipo.
- Validación del Kit Identifiler[®], utilizado en la etapa de amplificación.
- Validación de los kits utilizados para la extracción del ADN de muestras reales.
- Comparación de métodos de extracción evaluando contaminación cruzada.

"Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro"

René Descartes

GLOSARIO

Adenilación. Proceso durante la PCR en la que la polimerasa usualmente adiciona un nucleótido extra de Adenina que ayuda a producir picos bien definidos en los electroferogramas. [33]

ADN mitocondrial (mtADN). Molécula pequeña y circular de AND localizada en la mitocondria, contienen aproximadamente 16, 500 nucleótidos; la abundancia de cientos de copias de mtADN en cada célula hace que sea de utilidad para las muestras que contienen el material biológico limitado o dañado. [62]

ADN polimerasas. Son las enzimas que llevan a cabo la replicación de del ADN. [64]

Alelo. Forma alternativa de un gen o sección de ADN en una localización genética particular, locus; usualmente múltiples alelos son posibles con marcadores de STR. [62]

Allelic ladder. Es el estándar con el cual son comparados los STR para obtener el genotipo de una muestra. Los alelos en la escalera alélica necesitan ser comparados entre sí sobre el pico del umbral de detección de los datos almacenados, el software analiza y ordena correctamente los alelos del STR de las muestras desconocidas. Las medidas obtenidas para cada alelo en la escalera alélica son usados para determinar el genotipo final de las muestras desconocidas. [31]

Amelogenina. Marcador de uso genético que de que determina el sexo, se localiza en el esmalte de los dientes y el gen que codifica para el esmalte se produce tanto en cromosoma X como en el Y. [61]

Artefacto. Cualquier no-alelo producto del proceso de la amplificación, stutter o menos A, o anomalías en el proceso de detección. [62]

Autosomas. Todos los cromosomas que no son sexuales. [9]

Bases nitrogenadas. Compuestos de los que está formado el ADN, Adenina, Timina, Guanina y Citosina. Se denominan así porque contienen nitrógeno es su estructura química. [8]

Calidad. Conjunto de propiedades y características de un producto, proceso o servicio que le confieren su aptitud para satisfacer las necesidades establecidas o implícitas. [65]

Código genético. Información genética que existente en cada gen. [6]

Control de Calidad. Es el proceso de regulación a través del cual se puede medir la calidad real, compararla con las normas o las especificaciones y actuar sobre la diferencia. [65]

Control positivo de ADN. Se utiliza en los trabajos de rutina para confirmar que se obtiene el perfil correcto de STR. [18]

Cromosoma. Es la combinación de ADN con una matriz proteica que forma nucleoproteínas que se organizan en estructuras con propiedades tintoriales, se encuentran en el núcleo de las células, su

estructura es más fácil de observar durante la profase tardía, metafase y anafase de la división nuclear. [6]

Degradación. Fragmentación o ruptura del ADN por medios químicos o físicos. [29]

Electroferograma. Gráfica cuyos picos que representan fragmentos de ADN amplificados (STRs) marcados con fluorocromos y como fueron migrando a través del capilar, determinando así su tamaño (pb) y la fluorescencia que emiten (color). [28,70]

Elongar. Se refiere al proceso mediante el cual los nucleótidos se agregan a la creciente cadena de ADN. [69]

Estándar interno de medida, ILS. Es un estándar interno que se utiliza para poder determinar el size de cada marcador, consisten en 22 fragmentos de ADN con un rango en la medida o size de 60-600pb. El estándar ILS 600 tiene el propósito de usarse para asignar las medidas o sizes de los fragmentos de ADN separados en la electroforesis usando una variedad de instrumentos de fluorescencia. [30, 62]

Estándar. Criterios establecidos para propósitos de control de calidad que imponen requisitos específicos en los laboratorios y analistas; también se refiere a las muestras bien caracterizadas que pueden ayudar a la calibración en las mediciones. [62]

Exactitud. Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. [35]

Filiación. Vínculo jurídico que une a un hijo con su padre o con su madre y que consiste en la relación de parentesco establecida por la ley entre un ascendiente y su inmediato descendiente [50].

Fluorescencia. Emisión de luz de una molécula a partir de su excitación por la energía de la luz, en el contexto de análisis de ADN, diferentes tintes fluorescentes permiten la detección simultánea de productos PCR de medidas similares, realizado a través de emisión de fluorescencia de diferentes colores. [62]

Fluorocromo. Molécula capaz de emitir fluorescencia después de un período de excitación. [70]

Formamida. Se utiliza en la electroforesis capilar para estabilizar las cadenas sencillas de ADN desnaturalizado. La formamida altamente des ionizada se utiliza para resuspender las muestras de ADN antes de la inyección electrocinética en los sistemas de electroforesis capilar. [64]

Gameto. Célula sexual. [9]

Gen. Región específica del ADN que ayuda a determinar una característica. [12]

GenBank®. Es una base de datos que contiene secuencias de nucleótidos a disposición del público por de más 380.000 organismos con nombre a nivel de género o menores, obtenidos principalmente a través de las comunicaciones de los distintos laboratorios en todo el mundo. [68]

Genoma. Todo el material genético en los cromosomas de un organismo particular; la medida es dada generalmente por el número total de pares de bases. [62]

Genotipo. Conjunto de alelos que posee un organismo individual. [12]

Heterocigoto. Cuando un individuo posee dos alelos diferentes, uno proveniente del padre y otro de la madre, en un locus determinado. [12]

Homocigoto. Cuando un individuo posee dos alelos iguales, uno proveniente del padre y otro de la madre, en un locus determinado. [12]

Kits. Ensayos comerciales que contienen una serie de reactivos. [15]

Loci. Unión de varios *locus*. [11]

Locus. Lugar físico específico que un gen ocupa dentro de un cromosoma. [11]

Marcador. Gen o secuencia específica de ADN localizado en un lugar conocido en el cromosoma, usado como punto de referencia para asignar otros loci. [62]

MasterMix. Es un reactivo que contiene ADN polimerasa, dNTPs, un buffer y estabilizadores. Es ideal para aplicaciones de PCR de rutina de las plantillas incluidas las soluciones de ADN puro, colonias de bacterias, y productos de cDNA. [63]

Microvariantes, son alelos nuevos que se encuentran en la población humana que difieran en uno o más pares de bases de los alelos que comúnmente son estudiados con los marcadores de ADN ya estandarizados. Se denominan así porque la variación es muy pequeña. [33]

Muestra de referencia. Muestra, generalmente de sangre o hisopado bucal, tomado de una persona conocida, es usada con propósitos de comparación con una muestra de prueba, a veces es referida como “K” o muestra conocida. [62]

Multiplex PCR. Co-amplificación de múltiples regiones del genoma con más de un conjunto de primers; permite que la información de diferentes secuencias blanco sean colectadas simultáneamente. [62]

Mutación. Cualquier cambio heredable en la secuencia de ADN; alteración o cambio en un alelo de un locus genético resultando en incompatibilidad genética entre los padres y los hijos. [62]

Nucleótido. Unidad de ácido nucleico compuesto por fosfato, ribosa o desoxirribosa y una base de purina o pirimidina. [62]

Off-ladder. Productos de amplificación que son diferentes a los establecidos en la escalera alélica (allelic ladder), por lo tanto no pueden ser etiquetados y salen de la ladder. [33]

Pares de bases (pb). Dos nucleótidos complementarios unidos por enlaces de hidrógeno; el apareamiento ocurre entre la A y T y entre la G y C. [62]

Perfil completo. Resultado completo de ADN con valores obteniéndose de todos los loci. [62]

Poder de discriminación. Poder potencial de un marcador genético o set de marcadores para diferenciar entre dos personas elegidas al azar. [62]

Polimorfismo. Diferencia en la secuencia de ADN entre los individuos. Las variaciones genéticas ocurren en más de 1% en una población. [62]

Precisión. Medida de la cercanía de los resultados cuando un experimento es repetido. [62]

Primer o cebador. Pequeña cadena de polinucleótido preexistente, usualmente de 18-30 pb, que se dirige a una región específica de un templado de ADN y permite que la ADN polimerasa inicie la síntesis de la cadena complementaria. [62]

Proporción. Relación de la altura de los picos heterocigotos. [48]

Reproducibilidad. Habilidad para obtener los mismos resultados cuando un examen o experimento es repetido. [62]

RFU. Unidades de Fluorescencia Relativa, refleja la intensidad de la fluorescencia emitida y representa la cantidad de ADN amplificado que se había inyectado. [28]

Ruido eléctrico. Ruido procedente de cualquier tipo de energía distinta de la correspondiente a la señal útil. [67]

Ruido. Cualquier perturbación eléctrica indeseable que tiene lugar dentro de la banda de frecuencias utilizada. Interferencias o aquellas señales no deseadas y que están unidas a la señal principal. [67]

Secuencia de ADN. Orden de los pares de bases, en un fragmento de ADN, gen, cromosoma o en un genoma completo. [62]

Secuenciador. Equipo en el que se lleva a cabo la secuenciación del ADN, significa que se identifica el orden exacto en que las bases del ADN, A, G, C y T, se suceden en los STR. Este equipo combina el método de la electroforesis capilar para separar los fragmentos de ADN con la tecnología de los tintes fluorescentes para marcarlos y posteriormente detectarlos en el electroferograma. [30]

Short tandem repeats (STR). Múltiples copias de una secuencia de ADN idéntico o similar, arreglados en sucesión directa, donde el tamaño de la unidad de secuencia repetida es de 2 a 6 pb; los STRs generalmente están en el ADN “basura” fuera de los límites de los genes, el número de unidades repetidas puede variar entre los individuos. [62]

Slipped-strand. Deslizamiento de la cadena, la polimerasa puede perder su lugar cuando copia una cadena de ADN produciendo un pico stutter. [33]

Stutter. Pequeños picos que aparecen inmediatamente antes o después del pico de un alelo real y son resultado del proceso de PCR cuando un STR loci es copiado por la ADN polimerasa. Se producen por Slipped-strand. [33]

Taq polimerasa. Es enzima que se encuentra en la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada también *Thermophilus aquaticus*, es una bacteria termófila que vive en la proximidad de las fuentes de agua calientes, a temperaturas comprendidas entre 50 y 80 °C, porque contiene enzimas que resisten tales condiciones. Por estas características muestra una temperatura optima para que se lleve a cabo la síntesis del ADN, tiene dos propiedades catalíticas: ADN polimerasa y una exonucleasa. [66]

Termociclador. Equipo en el que se llevan a cabo los ciclos de la PCR. Es un instrumento que permite realizar las copias de ADN a partir de la secuencia deseada. [25]

Tipificación o perfilación del ADN. Cadena de valores, números o letras, compilados de un examen de ADN. [62]

Validación: Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto [36].

Verificación. Confirmación mediante la exanimación de que los requerimientos específicos se han cumplido. [36]

REFERENCIAS

1. Lynn B. Jorde. “Genética Médica”, 3ª ed. [En línea]. Elsevier España. 2004 Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=CcsIHauMmTsC>> [Consulta: 26 Octubre 2010]
2. Programs, U.S.D.o.E.G. genomics.energy.gov. “Human Genome Project Information”. [En línea]. 2009. Disponible en: <http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/elsi/forensics.shtml> [Consulta: 9 febrero 2011]
3. Jenkins, John B. “Genética”, 2ª ed. Versión en español por el Dr. Alfonso Jiménez Sánchez. [En línea]. Reverte España.1985. Disponible en:<<http://books.google.com.mx/books?id=TX4UDZaKIUsC>> [Consulta: 26 Octubre 2010]
4. Farkas D. H., “DNA from A to Z”. [En línea]: Estados Unidos de América: AACCC Press. 2004. Disponible en:<http://books.google.com.mx/books?id=LZ2YIh_n92kC> [Consulta: 23 de Noviembre de 2010]
5. Strachan T, Read AP., “Human Molecular Genetics”. [En línea]: 2a edition. New York: Wiley-Liss; 1999. Disponible en:<<http://www.freebooks4doctors.com/fb/GENET.HTM>> [Consulta 24 de Febrero de 2010]
6. Thibodeau A. Gary y Patton T. Kevin. “Estructura y función del cuerpo humano”. [En línea]: 13ª ed. España: Elsevier Elsevier - Health Sciences Division. 2008. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=3tdLbY3FA4AC>> [Consulta: 6 de Noviembre 2010]
7. Riley, Donald E. Ph.D. 2005, “DNA Testing: An Introduction For Non-Scientists. An Illustrated Explanation”. Scientific Testimony an online journal. [En línea]. Revised Edition Posted April 6, 2005. Disponible en: <<http://www.scientific.org/tutorials/articles/riley/riley.html>> [Consulta 6 de noviembre 2010]
8. Brown, T., “Genomes”. [En línea]. Manchester, UK. 2002. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/#A5234>> [Consulta 24 de Febrero 2011]
9. Stansfield William. D. “Teoría y problemas de Genética”. Traducción Fraga Escamilla E. México: McGRAW-HILL/INTERAMERICANA. 1991.
10. Restrepo Fernández, Carlos Martín. “Pruebas de filiación, apuntes de Genética para abogados”. [En línea]: Bogotá, Colombia: Universidad el Rosario. 2007. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=zxBAOWrb-fQC>> [Consulta: 28 de septiembre, 2010].
11. Audesirk T. Audesirk G. y Byers B. E. “Biología de la vida en la tierra”. [En línea]: Pearson Educación, 2003. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=uO48-6v7GcoC>> [Consulta: 28 de septiembre, 2010].
12. Pierce Benjamín, P.P. “Genética, un enfoque conceptual”. [En línea]: 3ª ed. Estados Unidos: Panamericana. 2010. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=ALR9bgLtFhYC>> [Consulta: 13 Noviembre 2010].
13. Hallick, R. “The Biology Project”. [En línea]: University of Arizona. 2000. Disponible en: <http://www.biology.arizona.edu/human_bio/activities/blackett2/str_description.html> [Consulta: 4 de noviembre 2010]

14. Calabuig, J.A.Gisbert. "Investigación biológica de la paternidad", en: HUGUET Ramia, E. y CARRACEDO Álvarez, A. "Medicina legal y Toxicología". 5ª ed. Madrid, España: Masson, 1995.
15. FBI. The FBI, Federal Bureau of Investigation. [En línea] 2010. Disponible en: <<http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis>> [Consulta: 30 de Noviembre 2010]
16. Butler, J.M. "Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci in Human Identity Testing". J Forensic Sci, March 2006, Vol. 51, No. 2. 2006. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=gwDyBq2xLjIC>> [Consulta 24 de febrero de 2011]
17. Verheij S, Harteveld J, Sijen T. "A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples." Forensic Sci Int Genet. [En línea]. 11 Abril 2011. National crime squad, Hoofdstraat 54, 3972 LB Driebergen, The Netherlands. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530436>> [Consulta: 15 Abril 2011]
18. Promega, C. Technical Manual of Powerplex® 16 HS System. 2009. Disponible en: <<http://www.promega.com/tbs/tmd022/tmd022.pdf>> [Consulta: 27 de noviembre 2010]
19. Butler, J.M. "Short tandem repeat DNA, internet DataBase". Amelogenina. [En línea]. 2011 Disponible en: <<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/>> [Consulta 25 abril 2011]
20. B. C. Levin, D. K. Hancock, K. A. Holland, H. Cheng and K. L. Richie. "Human Mitochondrial DNA Amplification and Sequencing Standard Reference Materials SRM 2392 and SRM 2392-I". [En línea] National Institute of Standards and Technology, 2003. Disponible en: <<http://ts.nist.gov/MasurementServices/ReferenceMaterials/upload/sp260-155.pdf>> [Consulta: 25 de Mayo 2011].
21. Barbara C. Levin , Koren A: Hollanda , Diane K. Hancock Michael Coble , Thomas J. Parsons , Laura J. Kienker Diana W. Williams , MaryPat Jones , Kristy L. Richie. "Comparison of the complete mtDNA genome sequences of human cell lines - HL-60 and GMIO742A - from individuals with pro-myelocytic leukemia and leber hereditary optic neuropathy, respectively, and the inclusion of HL-60 in the NIST human mitochondrial DNA standard reference material - SRM 2392". [En línea] Disponible en: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/LevinHL60.pdf> [Consulta: 25 de Mayo 2011].
22. Pacho, A.A. y Sabán R. J., "Control Global Del Riesgo Cardiometabolico: la disfunción endotelial como diana preferencial, Volumen I". [En línea]. España: Díaz de Santos. 2009. 202,203, 205 p. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=k8ZmCxSjsXMC>> [Consulta: 19 Octubre 2010]
23. Sparkes R, Kimpton C, Gilbard S, Carne P, Andersen J, Oldroyd N, Thomas D, Urquhart A, Gill P. "The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artefacts, casework studies and success rates." [En línea]. Int J Legal Med. 1996;109(4):195-204. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007635>> [Consulta: 23 Febrero 2011]
24. Luque Cabrera, José y Herráez Sánchez, Ángel. "Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud". Madrid, España. Elsevier. 2001.
25. Cabrera, J.M.A., et al., "Autoinmunidad y enfermedad autoinmune". [En línea]. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. CIB. 2005. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=EiEEeKXzCEC>> [Consulta: 28 de Noviembre 2010].

-
26. Roche. "Applications of PCR ©1996-2010". Disponible en: <<http://molecular.roche.com/About/pcr/Pages/ApplicationsofPCR.aspx>> [Consulta 24 de Febrero de 2010]
 27. Sánchez, M.Á.S. and E.V. Gisbert, "Técnicas analíticas de contaminantes químicos aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias". [En línea]. España. Ediciones Díaz de Santos, S.A., 2004. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=Q1nbZ47NXFkC>> [Consulta: 6 de Diciembre 2010].
 28. Kobilinsky, L.F., T.F. Liotti, y J. Oeser-Sweat, "DNA: forensic and legal applications". [En línea]: United States of America. John Wiley & Sons, Inc. 2005. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=5JFFNbsq25cC>> [Consulta: 28 de Noviembre 2010].
 29. Butler, J.M. y Dr. Bruce R. McCord. "Capillary Electrophoresis Instrumentation: theory and application". [En línea]. Advanced Topics in STR DNA Analysis, Seattle, WA. 20 de Febrero 2006. Disponible en: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/AAFS2006_CETtheory.pdf> [Consulta: 11 de Febrero 2011].
 30. Berg, J.M., L. Stryer, and J. Tymoczko. "Bioquímica". [En línea]: España. Reverte, 2008. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=HRr4MNH2YssC>> [Consulta: 6 de Diciembre 2010].
 31. Davies Kevin. "La conquista del Genoma humano". . [En línea]: España. Paidós. 2002. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=nnI14We19oC>>. [Consulta: 6 de Diciembre 2010].
 32. Bioinformatics, F. "Possible Issues with DNA Evidence". [En línea] 2010; Disponible <en: <<http://www.bioforensics.com/genophiler/problems.html>> [Consulta 30 de noviembre 2010]
 33. Butler, J.M., "Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers". En: "Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci in Human Identity Testing". 2a Ed. Elsevier Academic Press. 2005.
 34. Butler, J.M. y Dr. Bruce R. McCord. "Introducción a STRs". [En línea]. Adaptado de Taller NEAFS Mystic, CT. Septiembre 29-30, 2004. Disponible en: <http://www2.fiu.edu/~mccordb/STR%20intro_Spanish.pdf> [Consulta: 28 de Febrero 2011].
 35. NMX-EC-17025-IMNC-2006, "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. México. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C. 2006. 14-17p.
 36. Guardado Pérez, Mercader Trejo. "Métodos analíticos adecuados a su propósito". [En línea]. Guía para la validación de métodos y temas relacionados, segunda edición, EURACHEN, CENAM, Querétaro, Noviembre de 2005, CNM-MRD-030- Disponible en: <<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/default.aspx?arch=/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>> [Consulta: 1 de Junio 2010].
 37. Castelluci F. "Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio". [En línea]. Resolución OENO 8/2005. OIV, Paris, 20 de Julio de 2005, Informe técnico. Disponible en: <http://news.reseauconcept.net/images/oiv_es/Client/Resolution_OENO_ES_2005_08.pdf> [Consulta: 9 de Marzo 2011].
 38. Cortes Colín R. "Validación de métodos de medición". [En línea]. ema, cumpliendo la misión de servir a México y a nuestros clientes. [Consulta: 8 de Marzo 2011]. Diponible en: <<http://www.udlap.mx/Conoce/video/files/ValidaciondeMetodosdeMedicion.pdf>>
-

-
39. Soso A., Ramini A., Marbán L., Fiorani V. "Validación de métodos analíticos". [En línea]. AACCS, BCR, IRAM. Disponible en: <http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf> [Consulta: 16 de Marzo 2011]
40. Moreno, J.Á. "Propuesta de documentación de validación de métodos para cumplir con la norma ISO/IEC 17025:1999". [En línea]. CENAM, Laboratorio de Impedancia, encuentro nacional de metrología eléctrica, Querétaro, Méx, Junio de 2005. Disponible en: <<http://www.cenam.mx/dme/pdf/EXTPropuesta%20de%20Documentaci%C3%B3n%20de%20Validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos.pdf>> [Consulta: 16 de Marzo 2011]
41. Barlandas Rendón, Quinrana Ponce, Lara Rodriguez, Gudiño Ramírez, Rosas García, Balderas Escamilla, Mitani Nakanishi, Pérez Urquiza. "Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico". [En línea]. CENAM-ema, México. Abril de 2008. Disponible en: <http://www.ema.org.mx/descargas/guias_tecnicas/ensayos_clinicos/laboratoriosclinicosv00.pdf> [Consulta: 30 de Octubre 2010]
42. Quintana Sandra. "Validación y verificación de métodos cuantitativos". [En línea]. ema. 29 de Octubre de 2010. Disponible en: <http://www.ema.org.mx/descargas/guias_tecnicas/ensayos_clinicos/laboratoriosclinicosv00.pdf> [Consulta: 12 de Noviembre 2010]
43. MIGLIARINO. "Validación de métodos cualitativos, caso de aplicación". [En línea]. Consultores. Disponible en: <<http://qcnet.com/Portals/75/PDFs/Validacion%20de%20Metodos%20Cualitativos.pdf>> [Consulta: 15 Marzo 2011]
44. Montoya, E.G. "Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos". [En línea]. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Disponible en: <http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0618102-102213/TOL82A.pdf> [Consulta: 8 de Septiembre 2010]
45. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. "Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario". [En línea]. Anexo 15: Cualificación y validación. Disponible en: <http://www.aemps.es/actividad/sgInspeccion/docs/guias_NCF/28_ANEXO_15.pdf> [Consulta: 15 de Marzo 2011]
46. Chaloner-Larsson G., Anderson R. Egan A. "Guía de la OMS sobre los requisitos de las practicas adecuadas". [En línea]. Segunda parte: Programa mundial de vacunas e inmunización suministro y calidad de las vacunas red mundial de capacitación. Organización Mundial de la Salud Ginebra 1998. Disponible en: <<http://www.who.int/vaccinesdocuments/DocsPDF/www9811.pdf>> [Consulta: 23 de Marzo 2011]
47. Rosas García E., Cortés Colín R. "Validación con base a los criterios de aplicación de la norma 17025 en mediciones químicas y físicas". [En línea]. ema Semana de acreditación 2009. Disponible en: <http://www.ema.org.mx/descargas/ema_semac09/11_junio/12aplicacion17025_11junio.pdf> [Consulta: 18 de Marzo 2011]
48. Promega Corporation. "Internal Validation of STR Systems". [En línea]. USA. Revisado en Octubre de 2006. Disponible en: <<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Validation%20Guides/Internal%20Validation%20of%20STR%20Systems.ashx>> [Consulta: 27 de Noviembre 2010]

-
49. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. "Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples." [En línea]. *J Forensic Sci.* 2001 Mayo, 46(3):647-60. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373004>> [Consulta: 26 de Marzo 2011].
50. Rossel Saavedra E. "Manual de derecho de familia". [En línea]. Colección Manuales Jurídicos. 7ª Ed. Chile, Editorial Jurídica de Chile. 1994. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=jsmD3N8WDZcC>> [Consulta: 6 de Noviembre 2010]
51. "Código Federal de Procedimientos Civiles". Diario Oficial de la Federación, México, 24 de febrero de 1943. Última reforma publicada el 30 de Diciembre de 2008.
52. Molina, M.d.J. "Filosofía de la ciencia". [En línea]. El concepto de la ciencia, 2007. Disponible en: <<http://www.molwick.com/es/metodos-cientificos/>> [Consulta: Consulta 24 de febrero 2010]
53. Calderón Saldaña J. P. y Alzamora De los Godos Uricia L. "Bioética aplicada a la investigación en las áreas de la salud". [En línea]. Lima Perú, 2010. Disponible en: <<http://conasin.web.officelive.com/Documents/Libro%20Bioetica.pdf>> [Consulta: 22 de Noviembre de 2010]
54. Henk A.M.J. ten Have and Michele S. Jean. "The UNESCO Universal Declaration on Bioethics and Human Rights: Background, Principles and Application". [En línea]. Paris, 2009, xvii + 353 pp Disponible en: <<http://hrlr.oxfordjournals.org/content/10/4/789.full?maxtoshow>> [Consulta: 4 de febrero de 2011].
55. Claude Vergés. "Genética y bioética en América Latina". [En línea]. Santiago 2004, Acta Bioética 2004; 10(2). Disponible en: <<http://www.scirus.com/srsapp/search?q=bio%C3%A9tica+en+gen%C3%A9tica&t=all&sort=0&g=s>> [Consulta: 24 de febrero de 2011]
56. González de la Vega R., Aguilar Ruíz M., Salas Chávez G., Arenas Villanueva J. "La investigación criminal". 3ª edición. México, D.F. Porrúa. 2004.
57. Ramos Miranda Pedro L. "La criminalística frente a la ética y la moral". [En línea]. Criminalística y ética. Disponible en:<<http://maestriaderechoprocesalpenalpedro.blogspot.com/>>[Consulta: 8 de Mayo 2011]
58. Jason R. Gilder, Keith Inman & William Shields, Dan E. Krane. "Magnitude-dependent variation in peak height balance at heterozygous STR loci". [En línea] 2010Disponible en: <http://www.bioforensics.com/articles/Magnitude_dependent_variation_in_peak_height_balance_at_heterozygous_STR_loci.pdf> [Consulta: 24 de Febrero 2011].
59. Benoît Leclair, Kathy L. Bowen y Ron M. Fourney. "Systematic Analysis of Stutter Percentages and Allele Peak Height and Peak Area Ratios at Heterozygous STR Loci for Forensic Casework and Database Samples". [En línea]. *J Forensic Sci*, March 2006, Vol. 51, No. 2. 2004. Disponible en: <<http://projects.nfstc.org/workshops/resources/literature/Systematic%20Analysis%20of%20Stutter%20Percentages%20and.pdf>> [Consulta: 26 de Marzo 2011].
60. Wayne L. Hoffman, P.D., Jill Cramer, B.S., Euy Kyun Shin, Ronald C. Barwick y Robert C. Giles. "Validación del kit PowerPlex® 16 de Promega para los exámenes de paternidad". [En línea]. Disponible en: <http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp11proc/paternity_minisymph/hoffman.pdf> [Consulta: junio 2010]
-

-
61. La voz de Michoacán. [En línea]. “Acreditan el laboratorio de la pgje”. Disponible en: <<http://www.vozdemichoacan.com.mx/secciones/pais/B00433309139.html?p=67896>> [Consulta: 13 de junio 2011]
 62. Helpful Resources on Forensic DNA Testing. [En línea]. “Basic Glossary of Forensic DNA Terms”. 2011. Disponible en: <www.cstl.nist.gov/.../Helpful-Resources-on-Forensic-DNA-Testing.pdf> [Consulta: 2 de Abril 2011]
 63. Promega Corporation® [En línea]. Disponible en: <<http://www.promega.com/applications/hmnid/productprofiles/ils600/Default.html>> [Consulta: 24 de Febrero 2011]
 64. Applied Biosystems™. [En línea]. Disponible en: <<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602056>> [Consulta: 24 de Febrero 2011]
 65. Calidad. [En línea]. “Introducción Conceptos de Calidad”. Disponible en: <<http://mgar.net/soc/isointro.htm#def1>> [Consulta: 2 de Abril 2011]
 66. M. J. McPherson y S. G. Moller. “PCR”. [En línea]. 2ª Ed. U.S. Taylor & Francis, 2006. Disponible en: <<http://books.google.com/books?id=NSSFjn2-SuUC&>> [Consulta: 2 de Abril 2011]
 67. Mataix Lorda M., Mataix Hidalgo M. “Diccionario de electrónica, informática y energía nuclear”. [En línea]. España. Ediciones Díaz de Santos. 1999. Disponible en: <<http://books.google.com.mx/books?id=BVDd8xRNQ3IC>> [Consulta: 2 de Abril 2011]
 68. Benson DA., Karsch-Mizrachi I. Lipman DJ., Ostell J., Sayers EW. “GenBank”. [En línea]. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20894, USA. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071399>> [Consulta: 2 de Abril 2011]
 69. Sparknotes. “DNA transcription”. [En línea]. Disponible en: <www.sparknotes.com/biology/molecular/dnatranscription/section2.rhtml> [Consulta: 2 de Abril 2011]
 70. Rangel Villalobos Héctor. “La prueba de paternidad”. [En línea]. NOTICONAQUIC 18 (49): 40-51. 2010. Disponible En: <<http://dnaprofile.com.mx/informacion-prueba-de-paternidad-adn.php>> [Consulta: 28 Febrero 2011]