



Rev Mex Med Forense, 2020, 5(1):24-33

ISSN: 2448-8011

Análisis genético de tres loci STR (TPOX, FGA, D18S51) en la población de Coyopolan, Veracruz, México

Artículo Original

Genetic analysis of three STR loci (TPOX, FGA, D18S51) in the population
of Coyopolan, Veracruz, Mexico

**Mayra Xolo Teobal ¹, Alfonso Alexander-Aguilera ², Ida Soto-Rodríguez ³, José
Armando Lozada-García ⁴, Carolina Barrientos-Salcedo ⁵**

Recibido: 19 Mayo 2019, Aceptado: 15 Julio 2019, Publicado: 15 Enero 2020

¹ Máster en Medicina Forense, Universidad Veracruzana

² Doctor en Ciencias, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana

³ Doctora en Ciencias, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana

⁴ Doctor en Ciencias, Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana

⁵ Doctora en Ciencias, Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana

Corresponding author: Carolina Barrientos Salcedo, cabarrientos@uv.mx

RESUMEN

La identificación de individuos a través del análisis de DNA se realiza mediante la tipificación de marcadores genéticos. Los marcadores STR se utilizan para estimar la frecuencia de un perfil genético. Los perfiles basados en amplificación por PCR de STRs tienen la ventaja de ser sensibles debido a que sus repeticiones generan alelos cortos, siendo útiles para especímenes en mal estado o degradados. En esta investigación se emplearon tres loci STR: TPOX FGA Y D18S51, debido a que generan alelos polimórficos bien establecidos y se puede contrastar la variabilidad genética de estos loci en la población de Coyopolan, un pueblo de origen totonaco muy antiguo, y donde deben haber llegado los toltecas después de la destrucción de Tula en 1116 y que, debido a su boscosa geografía, se ha constituido en una población conservada (Gobierno del Estado de Veracruz, 1998). Se recolectaron muestras sanguíneas de 186 individuos al azar, se realizó extracción de DNA, se amplificó por PCR, se visualizaron los productos en geles de agarosa y se secuenciaron para identificar los alelos. Los tres STR en esta población indican baja heterocigocidad respecto a la observada en la población mexicana; y con base al valor obtenido de chi-cuadrada ($5.9 > 3.84$) la población no está en equilibrio de Hardy Weinberg para estos marcadores. Se propone ampliar el estudio, para poder identificar a los individuos provenientes de esta región, lo cual es de gran ayuda en la investigación médica forense. Palabras clave. loci, Población, STRs, TPOX, FGA, D18S51, Coyopolan, Veracruz

SUMMARY

The identification of individuals through DNA analysis is performed by typing genetic markers. STR markers are used to estimate the frequency of a genetic profile. Profiles based on PCR amplification of STRs have the advantage of being sensitive because their repeats generate short alleles, being useful for specimens in poor condition or degraded. Three STR loci were used in this investigation: TPOX FGA and D18S51, because they generate well established polymorphic alleles and the genetic variability of these loci can be checked in the population of Coyopolan, a town of very old Totonaco origin; toltecs would have arrived there after the destruction of Tula in 1116; due to its forested geography, it has become a conserved population (Government of the State of Veracruz, 1998). Blood samples were collected from 186 random individuals, DNA extraction was performed, PCR amplified, products were visualized on agarose gels and sequenced to identify alleles. The three STRs in this population indicate low heterozygosity with respect to that observed in the Mexican population; and based on the value obtained using chi square ($5.9 > 3.84$) the population is not in Hardy Weinberg equilibrium for these markers. It is proposed to expand the study, in order to identify individuals from this region, which is a great help in forensic medical research.

Keywords. loci, Population, STRs, TPOX, FGA, D18S51, Coyopolan, Veracruz

INTRODUCCIÓN

La delincuencia organizada trae consigo la desaparición de numerosas personas; por ello la identificación de los cuerpos o restos humanos es importante en el proceso de reparación del daño a los familiares y a la sociedad en general (RNDPED, 2017). La identificación de cadáveres completos o restos humanos permite darles un nombre y apellidos a los individuos. La Genética forense es una de las ciencias que aplica el método científico empleando los conocimientos propios de Genética, pero enfocados al campo forense, utiliza el análisis de DNA, lo cual ha permitido la identificación de numerosos cuerpos y restos humanos (CICR, 2009) con el apoyo de los métodos empleados en la Genética de poblaciones.

La identificación a través del análisis de DNA se realiza mediante la tipificación de marcadores genéticos que cumplen la característica de ser altamente discriminatorios entre individuos no relacionados y más estrechos entre individuos relacionados. Para el proceso de identificación se realiza la comparación del perfil genético que se obtiene de los cuerpos o restos humanos y los perfiles obtenidos de familiares o la coincidencia al azar que se encuentre con los perfiles incorporados a las bases de datos. En la identificación por medio de coincidencia de perfiles genéticos se utilizan las bases de datos que se enriquecen con los perfiles obtenidos de cadáveres, hechos delictivos y la población en general; sin embargo, estas bases se encuentran limitadas por la gran cantidad de muestras, superando la capacidad de los laboratorios para procesarlas. Cuando se obtiene una coincidencia de perfiles genéticos se realizan cálculos estadísticos para comprobar el vínculo biológico, para lo

cual se utilizan frecuencias alélicas obtenidas de estudios poblacionales (PGR, 2015).

En México la población actual es considerada mestiza, al ser una mezcla entre los conquistadores y la población nativa, hace que la carga genética de las poblaciones sea compleja y más aún los factores que la modifican constantemente tales como los sociales, demográficos y económicos. Por consiguiente, hay variaciones en la distribución alélica de la población, y modificaciones según la región geográfica (Saiz, et al., 2016).

Para aportar herramientas de análisis genético que ayuden a las ciencias forenses del país a resolver problemas durante el proceso de identificación de individuos, en México se llevan a cabo análisis de las frecuencias alélicas de los marcadores STR empleados de manera rutinaria por la genética forense para la identificación de individuos. Es por ello que la Procuraduría General de la República fortalece la base de datos de perfiles genéticos con los recabados de los laboratorios forenses; sin embargo estas bases se encuentran limitadas pues no se realiza un estudio de poblaciones en todos los estados, además los perfiles ingresados a estas bases corresponden a familiares de desaparecidos, es decir, no a una población en general. De esta manera, la gran cantidad de muestras que ingresan a los servicios forenses y que superan la capacidad de los laboratorios para procesarlas, no robustecen las bases de datos nacionales (PGR, 2015). Por lo cual, es importante el realizar estudios de variabilidad genética en poblaciones para corroborar que cumplan la ley de Hardy Weinberg y, de este modo identificar frecuencias alélicas que permitirán ampliar las bases de datos existentes y validar la población para utilizar de forma

confiable los sistemas para estimar la frecuencia de un perfil genético en un caso criminal, para identificar un cadáver o calcular la probabilidad de paternidad (Ramos et al., 2016; Zauza, 2015).

La localidad de Coyopolan, al estar situada lejos de la urbanización, tiene acceso limitado, escasa migración de sus habitantes y el bajo número de habitantes en los que se puede presentar reproducción aleatoria, se considera una localidad conservada y es por ello que se eligió para este estudio; sin embargo, se debe establecer y comprobar si es una población que se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg. Para ello se realizó el análisis genético de tres loci STR, el marcador TPOX de menor polimorfismo, así como FGA y D18S51 altamente polimórficos. De este modo se puede contrastar la variabilidad genética de estos loci en la población a través de la heterocigosidad observada en cada marcador y determinar si esta población es ideal en la identificación de frecuencias alélicas para enriquecer las bases de datos existentes con nuevas frecuencias alélicas que ayuden obtener cálculos estadísticos forenses más precisos para el Estado de Veracruz.

Objetivo

Identificar los alelos y conocer el índice de heterocigosidad de tres loci STR (TPOX, FGA, D18S51) presentes en la población de Coyopolan, Veracruz, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

A los participantes se les informó de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento; se obtuvieron muestras sanguíneas con anticoagulante (EDTA) de

186 individuos voluntarios al azar, residentes de la localidad de Coyopolan, Ixhuacán de los Reyes, Veracruz. Se mantuvo el anonimato y la confidencialidad de sus datos.

Se realizó la extracción de DNA de las muestras sanguíneas con el método de Daly et al., 1996 (Tris-Tritón-Sacarosa). Para verificar que en el proceso de extracción se obtuvo DNA se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio (0.01 ug/ml), con una corriente de 120 volts durante 40 minutos. El gel se observó en el trasiluminador UV.

Para realizar la amplificación por la técnica de PCR en punto final, de los marcadores STR's: FGA, TPOX, D18S51 se consultó en la base de datos STR del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos (NIST) y se identificaron los oligonucleótidos para cada marcador, los cuales se introdujeron a la herramienta computacional BLAST por sus siglas en inglés "Basic Local Alignment Search Tool", para corroborar que esta secuencia es específica para cada marcador. Posteriormente con los programas Fast PCR 6.5.55 y Net Primer se obtuvieron las Tm (temperaturas de fusión) con las cuales se elaboraron los programas en el termociclador óptimos para la amplificación de cada marcador (Kalendar et al., 2017).

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: FGA 5'-GGCTGCAGGG CATAACATTA-3' y 5'-ATTCTATGACTTTGCGCTTCAGGA-3'; TPOX 5'-GCACAGA ACAGGCACTTAGG-3' y 5'-CGCTCAAACGTGAGGTTG-3'; D18S51 5'-TTCTTGA GCCCAGAAGGTTA-3' y 5'-ATTCTACCAGCAACAACACAAATA

AAC-3'. Para cada reacción se emplearon los oligonucleótidos a 2.0 μ M, < 250 ng de DNA y 0.02 UI/ μ l de Pfu-DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific). Y se amplificaron con 30 ciclos; cada ciclo con una temperatura inicial de 98°C durante 2 minutos, seguido de un ciclo que consta de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 56.8, 58.0 y 59.3 para alinear los oligonucleótidos de TPOX, FGA y D18S51 respectivamente; y 72°C durante 30 segundos; dando una extensión final de 72°C durante 10 minutos. Para la visualización de los amplificados se preparó gel de agarosa de bajo punto de fusión al 4% con una corriente de 120 volts durante 2 horas. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb y 100 pb para comparar los amplificados obtenidos. El gel se observó en un trasiluminador UV. Se purificaron los amplicones con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y se realizó la secuenciación tipo Sanger. Al obtener el tamaño de los amplicones de cada loci se consultó la base de datos STR del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología para identificar los alelos. Para

el análisis estadístico se utilizó la siguiente fórmula para determinar las frecuencias alélicas para cada marcador (Amorin, 2016).

$$f(A) = \frac{\text{número de alelos observados}}{\text{total de alelos}}$$

Para determinar la heterocigosidad observada (HO) y la heterocigosidad esperada (HE) se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$HO = 1 - \sum \text{frecuencias}$$

$$HE = 1 - \sum \text{frecuencias}^2$$

Para la prueba de chi-cuadrado se utilizó

$$\chi^2 \sum \frac{\text{número observado} - \text{número esperado}^2}{\text{número esperado}}$$

RESULTADOS

En la población en estudio se identificaron 8 alelos del loci FGA, 3

alelos diferentes para el loci TPOX y 4 para el loci D18S51, como se muestra en la tabla I.

loci	Tamaño del amplificado(pb)	Alelo	Número de muestras
FGA	310 pb	13	32
	314 pb	14	5
	330 pb	18	5
	346 pb	22	11
	350 pb	23	74
	354 pb	24	2
	386 pb	32	14
	400 pb	35.2	15
TPOX	282 pb	11	51
	290 pb	13	49

	302 pb	16	35
D18S51	290 pb	8	24
	302 pb	11	35
	350 pb	23	38
	366 pb	27	50

Tabla I. Alelos identificados en cada loci, de acuerdo a su tamaño en pb

De 135 muestras analizadas para el loci TPOX se identificaron los alelos 11, 13 y 16, el alelo 11 se presentó con mayor frecuencia (Tabla II). No se obtuvo el índice de heterocigosidad para este marcador, pues del total de las muestras analizadas en todas se observaron homocigotos. Para el marcador D18S51 se identificaron los alelos 8, 11, 23, 27, fue el

alelo 23 el que se presentó con mayor frecuencia. (Tabla II). No se observaron heterocigotos. Para el loci FGA se identificaron los alelos 13, 14, 18, 22, 23, 24, 32 y 35.2, siendo más frecuente el alelo 23 y menos frecuente el alelo 24 (Tabla II), se observaron 112 homocigotos y 23 heterocigotos (Tabla III).

Alelo	TPOX	FGA	D18S51
8			0.2592
11	0.3777		0.2814
13	0.3629	0.2111	
14		0.0185	
16	0.2592		
18		0.0185	
22		0.0407	
23		0.4888	0.3703
24		0.0074	
27			0.088
32		0.1037	
35.2		0.1111	

Tabla II. Frecuencias alélicas en cada loci.

Homocigotos	Heterocigotos	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada
112	23	15.3 %	28.2%

Tabla III. Índice de heterocigosidad en la población en estudio.

Con el análisis de Chi-cuadrada para estos loci se obtuvo el valor de $X^2 = 5.9$, para obtener la probabilidad asociada a este valor en relación con la ley de Hardy Weinberg donde el grado de libertad para este análisis es 1 con un valor de 3.84, siendo $5.9 > 3.84$ se determina que la población no se encuentre en equilibrio Hardy Weinberg para estos marcadores.

DISCUSIÓN

A nivel interpoblacional se deben estimar nuevas frecuencias alélicas y comprobar que la población en la que se utiliza el sistema de análisis genético se encuentre en equilibrio Hardy Weinberg, pues esto permite emplear las fórmulas del binomio al cuadrado para estimar la frecuencia de genotipos a partir de las frecuencias alélicas obtenidas de la población. También se deben validar las poblaciones para que se puedan utilizar de forma confiable estos sistemas en la determinación de la frecuencia de un perfil genético en un caso criminal o calcular la probabilidad de paternidad cuando coinciden un supuesto padre y el hijo (Zauza, et al., 2015) es por ello que se realizó esta investigación para conocer a la población en estudio.

Existe una pequeña cantidad de estudios en población mexicana que provean datos de frecuencias alélicas poblacionales. En México los estudios poblacionales reportados son los realizados en Chihuahua por Martínez y colaboradores en el 2005; en el área metropolitana del centro de México por el grupo de Macías en el 2013; en Zacatecas en el 2013 Hernández y Trejo emplearon 15 marcadores STR para conocer las frecuencias alélicas de esa población; en Guerrero López y colaboradores en 2016

estudiaron tres grupos étnicos del suroeste mexicano; mientras que en Ciudad de México Saiz y un grupo de colaboradores en 2016, estudiaron la variación genética en la mayor metrópolis del país; y finalmente en Monterrey Ramos y su grupo, empleando un equipo automatizado de última generación para 2016, caracterizaron genéticamente a la población mestiza del noreste de México. Los resultados de estos análisis poblacionales han permitido ampliar las bases de datos existentes, siendo útiles como herramientas más precisas en casos forenses.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, donde se realizó el análisis genético de tres marcadores STR (TPOX, FGA y D18S51) en un grupo poblacional mestizo del estado de Veracruz, en los loci TPOX y D18S51 no se observaron heterocigotos y en el loci FGA hubo 23 heterocigotos, con 15.3% de heterocigosidad, 28.2% de heterocigosidad esperada y Chi-cuadra de 5.9; estos resultados se compararon con estudios hecho en población mexicana, en los cuales, Martínez y colaboradores en 2005, reportaron para Chihuahua alto nivel de polimorfismo en los marcadores FGA y D18S51, en cuanto al menos polimórfico fue TPOX, cumpliendo las expectativas de Hardy-Weinberg (Martínez et al., 2005).

Los estudios de Hernández y Trejo (2014) en Zacatecas, López y colaboradores (2016) en Guerrero, Saiz (2016) en Ciudad de México reportaron heterocigosidad alta en los marcadores analizados y equilibrio Hardy Weinberg para sus poblaciones. Mientras que en los resultados obtenidos en este estudio, hubo baja heterocigosidad en los loci analizados y la población está fuera de equilibrio de Hardy Weinberg. Esto puede deberse a que

la población está siendo afectada por algún factor como migración, mutación y matrimonios consanguíneos. En la provincia Iraní de Khuzestan, Irán se reportaron resultados similares a este trabajo, donde ninguno de los loci analizados estaba en equilibrio Hardy Weinberg, debido a las muchas subpoblaciones y demasiados matrimonios consanguíneos (Mohammad et al., 2014). Por lo que se recomienda ampliar el estudio aumentando la cantidad de marcadores STR, utilizando un método más sensible (el empleado es este trabajo no es el de mayor sensibilidad respecto a otros) y también analizar a toda la población, para determinar que la población en general no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg o solo para estos marcadores, de este modo conocer si cumple las condiciones para crear una base de datos con frecuencias alélicas de la zona, enriqueciendo las bases de datos existentes y que puedan ser aplicables para cálculos en casos forenses.

Conclusión

Los marcadores FGA, TPOX y D18S51 en la población de Coyopolan municipio de Ixhuacán de los Reyes, Veracruz, indican baja heterocigocidad y con base al valor obtenido de chi-cuadra ($5.9 > 3.84$) la población no está en equilibrio de Hardy Weinberg, no coincidiendo con los reportados en la población mexicana.

REFERENCIAS

1. Gobierno del Estado de Veracruz, Secretaría Técnica del C. Gobernador, 1998, p.51
2. Consejo Nacional de Seguridad Pública. Registro Nacional de Datos de Personas Extraviadas o Desaparecidas. Informe anual. 2017; 1-52. Disponible en www.gob.mx/RNDPED.
3. Comité Internacional de la Cruz Roja. Personas desaparecidas, análisis forense de DNA e identificación de restos humanos. 2da. Edición. 2009; 8-15. Disponible en www.cicr.org.
4. Procuraduría General de la República. Protocolo para el tratamiento e identificación forense. 2015; 1: 5-80. Recuperado de www.gob.mx/pgr.
5. Saiz M, Rios RR, Alvarez JC, Lorente JA, Villegas CD, Ramirez FE, et al. Genetic variation of 17 STR loci in a Mexican Mestizo population from Mexico City. Int J Legal Med. 2016; 130(6):1505-1507.
6. Ramos GB, Aguilar VJ, Chávez BM, Delgado CJ, Alfaro LE, Rangel VH. Population data of 24 STRs in Mexican-Mestizo population from Monterrey, Nuevo Leon (Northeast, Mexico) based on Powerplex ((R)) Fusion and GlobalFiler ((R)) kits. Forensic Sci Int Genet. 2016; 21: 15-7.
7. Zauza C, Rosenfeld M, Estrada J. Análisis de las variaciones en el número de repeticiones de 5 marcadores ancestrales en donadores recurrentes en México Perinatol Reprod Hum. 2015; 29 (4):152-156.
8. Daly AK, Steen VM, Fairbrother KS, Idle JR. CYP2D6 multiallelism. Methods Enzymol. 1996; 272:199-210.

9. Butler J, Reeder D. STRBase (SRD-130). National Institute for Standards and Technology. Update on 04/04/2019.
10. Kalendar R, Khassenov B, Ramankulov Y, Samuilova O, Ivanov KI 2017. FastPCR: in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. Genomics, 109: 312-319. DOI: 10.1016/j.ygeno.2017.05.005.
11. Amorim A. and Budowle B. 2016. Handbook of Forensic Genetics. Biodiversity and Heredity in Civil and Criminal Investigation. World Scientific Ed. ISBN: 978-1-78634-077-1.
12. Martínez GL, Martinez EE, Fernández RF, Moguel M, Entrala C, Alvarez CJ, et al. Mexican Population Data on Fifteen STR Loci (Identifiler® Kit) in a Chihuahua (North Central Mexico) Sample. Journal of Forensic Sciences. 2005; 50(1): 1-3.
13. Macías VM, García FR, Miranda GE, Páez RJ. Datos genéticos poblacionales de 15 marcadores tipo «short tandem repeats» empleados en las pruebas de paternidad e identificación de individuos por genética forense en el área metropolitana de la región del centro de México. Revista Española de Medicina Legal. 2013; 39(2): 48-53.
14. Hernández RA, Trejo MF. Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. ArchiviMedPub Journals. 2014; 10(1:1): 1-24.
15. López PM, Iturbe CP, Huang Q, Arroyo PE, Mesa SM. Genetic polymorphism of 15 STR loci in 3 ethnics groups of Guerrero State, Mexico. Forensic Sci Int Genet. 2016; 25: 8-9.
16. Mohammad FA, Jari M, Reza KS, Abdollahi A, Ahmadi L, Heudaru M. Genetic analysis of two STR loci (VWA and TPOX) in the Iranian province of Khuzestan. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2014; 17(8): 584-587.

