

Análisis de marcadores STR sobre el cromosoma X en una población de Bogotá

LUZ MIRYAM SIZA FUENTES MSc(C)¹, DAISSY LORENA SÁNCHEZ MSc(C)¹,
YENNY MILENA GÓMEZ MSc¹, CARLOS MARTÍN RESTREPO PhD¹,
ANDRÉS GUTIÉRREZ MSc¹, DORA JANETH FONSECA MSc¹

Resumen

El análisis de marcadores del cromosoma X ha sido ampliamente usado en el área de la genética clínica, particularmente, para el análisis molecular de enfermedades ligadas al X. Recientemente, se han reconocido muchas repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeats*, STR) sobre este cromosoma, por su importancia en análisis forense y de paternidad. Los marcadores gonosómicos son especialmente eficientes para resolver casos difíciles, ya que las probabilidades de exclusión media son mayores que con los marcadores STR autosómicos.

Objetivo. Determinar la frecuencia alélica y haplotípica de 10 marcadores STRs sobre el cromosoma X en 200 muestras de hombres no relacionados de la ciudad de Bogotá.

Materiales y métodos. Se analizaron 200 muestras de sangre de hombres no emparentados nacidos en Bogotá. El ADN genómico fue extraído mediante la técnica Whatman FTA y amplificados por PCR. Los productos se analizaron en un secuenciador automático *ABI Prism 310*, con el software *GeneMapper*, versión 3.2.

Resultados. Los sistemas evaluados indicaron la presencia de 6 a 11 alelos, con el mayor polimorfismo para los sistemas DXS6809 y DXS6789, seguido por el sistema DXS9902. Las frecuencias alélicas oscilaron entre 0,005 y 0,565, mientras que la frecuencia haplotípica fue de 0,005. Los parámetros forenses utilizados en este estudio reportaron que el sistema DXS7132 mostró una mayor diversidad y PD (0,832211 y 0,82805) respectivamente indicando que este sistema es altamente informativo; el sistema que presentó menor diversidad y PD fue el sistema DXS7133.

Conclusión. Los diez marcadores analizados en este estudio permiten la genotipificación simultánea de los 10 STRs en solo una PCR, adicionalmente se evidenció que los marcadores analizados son ampliamente informativos y que su utilización puede ser de gran aporte en la práctica forense, particularmente en los casos de parentesco u otras deficiencias.

¹ Genética Molecular de Colombia Ltda., Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 26-11-2009

Revisado: 13-04-2010

Aceptado: 16-06-2010

Palabras clave: frecuencias alélicas, marcadores, STR, cromosoma X, Bogotá, Colombia.

Title

STR Markers Analysis on X Chromosome in a Population from Bogotá

Abstract

X chromosome markers analysis has been used widely in the clinical genetics area, particularly in molecular diseases X-linked analysis. Recently, many short tandem repeats (Short Tandem Repeats, STRs) on this chromosome has been recognized, by importance in forensic and paternity analysis. The gonosomal markers are particularly efficient resolve difficult cases, since the odds of half exclusion outweigh the STR autosomes markers.

Objective. Determine the allelic frequency and haplotype frequency of 10 STRs markers located on the X chromosome, in 200 samples of unrelated men in the Bogotá city.

Materials and methods. 200 blood samples were analyzed from unrelated males born in Bogotá. DNA extraction was performed using the Whatman FTA technique and PCR amplified. The products were analyzed in automatic sequencer ABI Prism 310, software GeneMapper, version 3.2.

Results. The systems tested, showed of 6-11 alleles, with greater polymorphism DXS6809 and DXS6789 systems and this followed for DXS9902 system. The range of Allele frequencies from 0.005 to 0.565, while the haplotype frequency was 0.005. The forensic parameters used in this study, reported that the DXS7132 system showed greater diversity and PD (0.832211 and 0.82805) respectively, suggesting that this system is highly informative, the system had lower PD and diversity DXS7133 system.

Conclusion. The ten analyzed markers in this study allow simultaneous genotyping of 10 STRs in only one PCR additionally revealed that informative markers are widely analyzed and their use can greatly contribute in forensics practice, particularly in cases of family or other deficiencies.

Key words: allele frequencies, markers, STR, chromosome X, Bogotá, Colombia.

Introducción

Los marcadores *Short Tandem Repeats* (STR) autosómicos se emplean convencionalmente para determinar parentescos. Sin embargo, la existencia de casos complejos o no concluyentes requiere tener en cuenta un amplio número de marcadores autosómicos o el análisis de marcadores sobre los cromosomas sexuales X ó Y.

Con el advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se dio a conocer la existencia de los primeros marcadores sobre el cromosoma X. De éstos, los primeros descritos fueron HPRTB y ARA[1-3] de cuyo estudio se desprendieron las primeras formulas para realizar cálculos estadísticos de interés forense de los marcadores ubicados sobre el cromosoma X[3]. Esto permite determinar la relación de paternidad entre una hija, en presencia o ausencia de la madre, y un presunto padre, determinar la relación madre e hijo, realizar la reconstrucción del perfil paterno en presencia de la madre y de la hija, buscar la relación biológica entre abuela y nieta, ampliar el número de exclusiones en los casos dúo cuyo número de exclusiones no permita dar un resultado definitivo, aumentar la probabilidad de paternidad, etc.

El uso de los marcadores STR es, entonces, de gran utilidad, siempre y cuando se cuente con datos específi-

cos, como frecuencias en la población de cada uno de los marcadores utilizados en estas pruebas y procedimientos estadísticos, que permitan realizar los cálculos adecuados según sea el caso. Estos datos de población, sean frecuencias alélicas, frecuencias alélicas mínimas, poder de discriminación, diversidad por *locus*, tasa de mutación u otros, se han restringido a ciertas regiones de Colombia, lo cual impide su utilización[4, 5].

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia alélica y haplotípica de 10 marcadores STR sobre el cromosoma X en muestras de hombres no relacionados de Bogotá, obteniendo de esta manera los datos iniciales para esta región.

Materiales y métodos

Las muestras de sangre fueron recolectadas de 200 hombres no emparentados nacidos en Bogotá, previo consentimiento informado. El ADN fue extraído de la mancha de sangre mediante el método de extracción de Whatman FTA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuencia de cada cebador marcado con fluorocromo se detalla en la tabla 1.

La PCR múltiple se realizó a un volumen final de 10 μ l, que incluía: 0,5 μ l de ADN genómico, 5 μ l del

master mix PCR 1X el cual contenía concentraciones optimizadas de $MgCl_2$ 6 mM pH 8,7, dNTP y ADN polimerasa, 1 μ l de la mezcla de cebadores a una concentración 2 μ M. Las condiciones de termociclado fueron desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 10 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos y 72°C por 60 segundos, 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 90 segundos, 72°C por 60 segundos y extensión final a 60°C por 60 minutos.

La genotipificación se hizo mediante la comparación de muestras de referencia *Control DNA K562* de Promega y el control 9947A de *Applied Biosystems*. Para la electrofóresis capilar se preparó una mezcla de 12,5 μ l de formamida, 1 μ l de producto amplificado y 0,5 μ l del control interno LIZ 500 (*Applied Biosystems*). La separación y el análisis de las muestras se llevaron a cabo con el analizador genético ABI PRISM 310 (*Applied Biosystems*). Los resultados se analizaron con el *software GeneMapper*, versión 3.2.

Las frecuencias alélicas se calcularon mediante el programa *Genepop*. Para determinar la diversidad haplotípica y la diversidad por *locus*, se utilizó la fórmula descrita por Nei *et al.* en 1987[6]; el poder de discriminación se determinó mediante la ecuación descrita por Desmarais *et al.*[3].

Tabla 1
Secuencia, fluorocromos y tamaño del alelo de los cebadores

Locus	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Fluorocromo	Tamaño del alelo (pb)
DXS8378	5'TTAGGCAACCCGGTGGTCC3' 5'ACAAGAACGAACTCCAACCTC3'	6FAM	110-134
DXS9898	5'CGAGCACACCTACAAAAGCTG3' 5'TAGGCTCACCTCACTGAGCA3'	6FAM	145-179
DXS7133	5'CACTTCCAAAAGGGGAAAAA3' 5'ACTTGTACTTGGTGGGAGGAA3'	6FAM	184-212
GATA31E08	5'GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA3' 5'TCAGCTGACAGAGCACAGAGA3'	6FAM	223-263
GATA172D05	5'TAGTGGTGTATGGTTGCACAG3' 5'ATAATTGAAAGCCCGGATTC3'	VIC	107-135
DXS7423	5'GTCTTCCTGTATCTCCCAAC3' 5'TAGCTTAGCGCCTGGCACATA3'	VIC	158-198
DXS6809	5'TCCATCTTTCTCTGAACCTCC3' 5'TGCTTTAGGCTGATGTGAGG3'	VIC	232-276
DXS7132	5'TCCCCTCTCATCTATCTGACTG3' 5'CACTCCTGGTGCCAACTCT3'	NED	116-158
DXS9902	5'CTGGGTGAAGAGAAGCAGGA3' 5'GGCAATACACATTCATATCAGGA3'	NED	170-194
DXS6789	5'CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA3' 5'ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG3'	NED	248-296

Resultados y discusión

Se estudiaron 10 marcadores STR del cromosoma X mediante el análisis de 200 muestras de hombres no relacionados, nacidos en Bogotá, Colombia. La nomenclatura de los alelos fue designada por el número de repeticiones. Las frecuencias alélicas reportadas en este estudio oscilaron entre 0,005 y 0,565, la frecuencia haplotípica fue de 0,005 y la diversidad haplotípica fue igual a 1, lo cual

demuestra la gran heterogeneidad genética para estos marcadores en esta población.

Además, se encontraron 84 alelos en los 10 marcadores y de 6 a 11 alelos por sistema, siendo los sistemas DXS6809 y DXS6789 los más polimórficos. Los alelos 7 y 8 para el marcador DXS7133 se encuentran ausentes en la población de Brasil e Italia[7,8]. De forma similar, el alelo 7 del sistema GATA172D05 está au-

Tabla 2
Frecuencias alélicas y parámetros de interés forense de los diez marcadores
analizados sobre el cromosoma X

Alelos	DXS8378	DXS9898	DXS7133	GATA31E08	GATA172D05	DXS7423	DXS6809	DXS7132	DXS9902	DXS6789	
6					0,085						
7			0,005		0,005						
8	0,005	0,01	0,01	0,005	0,18						
8,3		0,115									
9	0,01		0,565	0,1	0,04			0,07	0,01		
10	0,485	0,02	0,165	0,05	0,27			0,01	0,03		
11	0,245	0,06	0,23	0,185	0,32			0,135	0,295		
11,1									0,09		
12	0,225	0,34	0,02	0,445	0,1	0,005		0,235	0,29	0,005	
12,1									0,085		
13	0,03	0,275	0,005	0,17		0,03		0,155	0,145		
13,1									0,015		
13,3		0,07									
14		0,105		0,045		0,3		0,205	0,035	0,02	
14,3		0,005									
15						0,45		0,165		0,045	
16						0,095		0,01		0,115	
16,3								0,01			
17						0,12		0,005		0,03	
18										0,005	
19									0,005	0,04	
20										0,415	
21										0,205	
22										0,095	
23										0,025	
28							0,005				
29							0,015				
30							0,01				
31							0,105				
32							0,155				
33							0,38				
34							0,225				
35							0,075				
36							0,02				
37							0,005				
38							0,005				
Sumatoria		0,3469	0,2245	0,3999	0,2757	0,22655	0,31685	0,2365	0,17195	0,20995	0,2421
PD		0,6531	0,7755	0,6001	0,7243	0,77345	0,68315	0,7635	0,82805	0,79005	0,7579
Diversidad por locus		0,656382	0,779397	0,60312	0,7279397	0,777336683	0,686583	0,767337	0,83221	0,79402	0,761709

sente en las poblaciones de Pakistán, Italia y Portugal, pero se observó en Alemania, Corea y en el presente estudio[8-10]. Por otro lado, los alelos 9 y 10 del sistema DXS7132 están ausentes en la población de Brasil, China y Portugal, y se han descrito en la

población de Italia y, actualmente, en el presente estudio[9-11].

Los parámetros forenses utilizados en este estudio reportaron que el sistema DXS7132 mostró una mayor diversidad y poder de discriminación

(PD) de 0,832211 y 0,82805, respectivamente, lo que indica que este sistema es muy informativo; el sistema que presentó menor diversidad y PD, fue el sistema DXS7133 (tabla 2).

En conclusión, los diez marcadores analizados en este estudio permiten la genotipificación simultánea de los 10 STR en sólo una PCR. Además, se evidenció que los marcadores analizados son ampliamente informativos y que su utilización puede ser de gran aporte en la práctica forense, particularmente, en los casos de parentesco u otras deficiencias.

Bibliografía

1. Hearne CM, Todd JA. Tetranucleotide repeat polymorphism at the HPRT locus. *Nucleic Acids Res.* 1991;19: 5420.
2. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics.* 1992; 12:241-53.
3. Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci.* 1998;43:1046-9.
4. Moreno MA, Builes JJ, Jaramillo P, Espinal C, Aguirre D, Bravo ML. Allele frequency distribution of five X-chromosomal STRS loci in an Antioquian population sample (Colombia). *J Forensic Sci.* 2005;50:1-2.
5. Builes JJ, Martínez RE, Espinal C, Aguirre D, Bravo ML, Gusmão L. Allele distribution of three X chromosome STR loci in an Antioquian population sample. *Forensic Sci Int. Genetics supplement Series.* 2008;1:140-1.
6. Nei M. *Molecular evolutionary genetics.* New York: Columbia University Press; 1987.
7. Turrina S, Atzei R, Filippini G, De Leo D. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. *Forensic Sci Int Gen.* 2007; 1:201-4.
8. Ribeiro EM, Neves FP, Hutz MH, Brabo TJ, Campos AK, Batista AE. A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci Int Gen.* 2008;2:154-8.
9. Tariq MA, Ullad O, Amer R, Sheikh R. Allele frequency distribution of 13 X-chromosomal STR loci in Pakistani population. *Int J Legal Med.* 2008; 122:525-8.
10. Pereira R, Gómez I, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Legal Med.* 2007;121:192-7.
11. Qui-ling L, De-jian LV, Xiang-Lin W, Hong-yu S, Xin-yao W, et al. Development of a five ChX STRs loci typing system. *Int J Legal Med.* 2008;122: 261-5.