



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

---

**“Determinación de Frecuencias Alélicas en Individuos  
con Enfermedad de Chagas del Estado de Hidalgo”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**LIC. EN BIOL. FELISA MARIEL ANTELIS BARRERA**

Directora de tesis

**DRA. JEANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA**

Co- Director de tesis

**DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO**

San Agustín Tlaxiaca Hgo., Agosto 2018.



25/julio/2018  
 AAM/MCBS/073/2018

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Felisa Mariel Antelis Barrera**  
**Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Determinación de frecuencias alélicas en pacientes con enfermedad de Chagas del estado de Hidalgo" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DR. JOSÉ LUIS IMBERT PALAFOX
- PRIMER VOCAL DRA. JEANNETT IZQUIERDO VEGA
- SECRETARIO DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO
- SUPLENTE M en C. ARELI CRUZ CASTAÑEDA
- SUPLENTE DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIAN MOYA ESCALERA  
 DIRECTOR



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Instituto de Ciencias de la Salud  
 Estación la Concepción s/n. Camino a Tlaxiaco  
 San Agustín Tlaxiaco, Hgo. C.P. 42100  
 Teléfono: 52 (771) 71 720 90 Ext. 4308  
 mtra\_bio\_sal@uaeh.edu.mx

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, al Área Académica de Medicina y al Posgrado en Ciencias Biomédicas y de la Salud, así como al Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por las facilidades otorgadas para la realización de la siguiente investigación.

Agradezco el apoyo recibido por parte del CONACyT (proyecto Ciencia Básica número 222180) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Esperanza Robles Peregrino, Jefa del Área de Epidemiología de la Clínica 32 del Instituto Mexicano del Seguro Social y al Hospital General de Pachuca por el apoyo para la toma de muestras.

A la M. en C. Areli Cruz Castañeda quien fungió como directora de esta investigación y a la Dra. Jeannett Izquierdo Vega por el apoyo otorgado.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por el espacio destinado para la realización del trabajo experimental, así como facilitar el uso de sus instalaciones y el equipo necesario para llevarlo a cabo.

Al laboratorio de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en especial al Dr. José de Jesús Olivares Trejo por sustentar y supervisar este proyecto.

Agradezco al Dr. José Luis Imbert Palafox y al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por las atenciones recibidas al formar parte del Comité Tutorial.

Durante el desarrollo de estos estudios se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca: 44854.

## **Lugar de Realización**

El presente trabajo se realizó en el Área Académica de Medicina del Posgrado en Ciencias Biomédicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), y en el laboratorio 4 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, además contó con financiamiento por parte del CONACyT (proyecto Ciencia Básica número 222180).

## Dedicatorias

A Fernando y Camila, por todo el tiempo que no estuve en casa y al regresar me esperaban con una sonrisa, todos mis esfuerzos y mis logros son pensando siempre en ustedes.

Jorge, gracias por darme la confianza que necesitaba para emprender el vuelo y ver mis sueños hechos realidad, por ser tú mi compañero de vida y elegirme a mí como la tuya.

A mis padres, gracias por todo el apoyo y hacerme lo que ahora soy, siempre serán mi gran ejemplo.

Areli, no cabe duda que Dios elige a las personas que pondrá en nuestras vidas en el momento preciso que lo necesitamos y doy mil gracias que hayas sido tú a quien eligió para ser mi guía en este gran reto.

A todos aquéllos que siempre estuvieron en cuerpo y mente a mi lado, gracias.

*“La ciencia y la vida ni pueden, ni deben estar separadas”  
Rosalind Franklin*

## Índice de figuras

Figura 1.	<i>Trypanosoma cruzi</i> en torrente sanguíneo	8
Figura 2	Amastigote de <i>T. cruzi</i> en torrente sanguíneo	9
Figura 3.	Epimastigote de <i>T. cruzi</i> en torrente sanguíneo	10
Figura 4.	Tripomastigote de <i>T. cruzi</i> en torrente sanguíneo	11
Figura 5.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 6.	Signo de Romana- Mazza	17
Figura 7.	Cardiopatía chagásica crónica	18
Figura 8.	Casos estimados de la enfermedad de Chagas en el mundo	20
Figura 9.	Distribución en México de especies de triatóminos	21
Figura 10.	Hibridación con sondas (Southern blot)	28
Figura 11.	Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	30
Figura 12.	Condiciones óptimas para la amplificación de ADN	65
Figura 13.	Diagrama de diseño experimental	69
Figura 14.	Placa en gel de agarosa al 1%	71
Figura 15.	Electroferograma de la muestra 46	73
Figura 16.	Gráfica de comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D18S51	76
Figura 17.	Gráfica de comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D21S11	79
Figura 18.	Gráfica de comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D7S820	82
Figura 19.	Gráfica de comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D5S818	85
Figura 20.	Gráfica de comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D8S1179	88
Figura 21.	Comparación de los parámetros estadísticos del grupo problema	95
Figura 22.	Comparación entre el grupo problema y el grupo control de número efectivo de alelos	96

## Índice de tablas

Tabla 1.	Definición de variables	53
Tabla 2.	Localización cromosómica y secuencia repetida de locus	62
Tabla 3.	Estandarización para la amplificación de ADN	64
Tabla 4.	Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D18S51	75
Tabla 5.	Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D21S11	78
Tabla 6.	Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D7S820	81
Tabla 7.	Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D5S818	84
Tabla 8.	Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D7S1179	87
Tabla 9.	Frecuencia de los alelos de cada loci analizado	90
Tabla 10.	Equilibrio de Hardy-Weinberg de los cinco marcadores analizado	92
Tabla 11.	Resultados de los parámetros estadísticos para el grupo problema	93
Tabla 12.	Resultados de los parámetros estadísticos para el grupo control	94

## Abreviaturas

ADN- Ácido Desoxirribonucleico  
ARN- Ácido Ribonucleico  
Ava I- Enzima de restricción  
Btg I- Enzima de restricción  
CODIS- Sistema de Índice Combinado de ADN (Combined DNA Index System)  
EDTA- Etilendiaminotetracético  
FBI- Buró Federal de Investigaciones (Federal Bureau of Investigation)  
HESP- Heterocigosidad esperada  
HOBS- Heterocigosidad observada  
ICSa- Instituto de Ciencias de la Salud  
IMSS- Instituto Mexicano del Seguro Social  
INEGI- Instituto Nacional de Estadística y Geografía  
NaCl- Cloruro de sodio  
NEA- Número efectivo de alelos  
pb- pares de bases  
PC- Probabilidad de coincidencia  
PCG- Posgrado en Ciencias Genómicas  
PCR- Reacción en cadena de polimerasa (polymerase chain reaction)  
PD- Poder de discriminación  
PGR- Procuraduría General de la República  
PIC- Índice de Contenido Polimórfico  
PNAS- Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias (Proceedings of The National Academy of Science)  
Pst I- Enzima de restricción  
RFLPs- Polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción  
Rsa I- Enzima de restricción  
STR's- Repeticiones cortas en tándem (Short Tandem Repeats)  
TAE- Tris ácido acético  
Taq- Thermophilus aquaticus  
TBE- Tris ácido bórico  
UACM- Universidad Autónoma de la Ciudad de México  
UAEH- Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
VNTR's- Número variable de repeticiones en tandem

	RESUMEN	4
	ABSTRACT	5
I.	INTRODUCCIÓN	6
II.	ANTECEDENTES	8
2.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	8
2.1.1	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
2.1.2	Modo de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
2.2	Enfermedad de Chagas	15
2.2.1	Características de la enfermedad de Chagas	16
2.2.2	Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas	19
2.3	ADN	22
2.3.1	Cromosomas	23
2.3.2	Genes	23
2.3.3	Genoma	24
2.4	Alelos	24
2.4.1	Frecuencias alélicas	25
2.4.2	Alelos dominantes	25
2.4.3	Alelos recesivos	25
2.4.4	Alelos polimórficos	25
2.4.5	Polimorfismo genético	25
2.5	Locus	26
2.5.1	Definición de locus	26
2.5.2	Técnicas para la identificación de locus	27
2.5.2.1	Hibridación con sondas (Southern blot)	27
2.5.2.2	Análisis por la reacción en cadena de polimerasa (PCR)	29
2.5.2.3	Biochips o microarrays	31
2.6	Genética de poblaciones	31
2.6.1	Equilibrio génico	32
2.6.2	Poblaciones en equilibrio	32
2.6.3	Ley de Hardy- Weinberg	33
2.6.4	Poder de discriminación	33
2.6.5	Probabilidad de coincidencia aleatoria	33
2.6.6	Heterocigosidad	34
2.6.7	Índice de contenido polimórfico	34
2.6.8	Número efectivo de alelos	34
2.7	Microsatélites	35
2.7.1	STR's Repeticiones cortas en tandem (Short Tandem Repeats)	36
2.7.2	CODIS: Sistema de índice combinado de ADN (Combinaded ADN Index System)	36
2.8	Diversidad genética	37
III.	ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	38

3.1	Enfermedad de Chagas en México	38
3.2	Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en México	38
3.3	Diversidad genética en México	39
3.4	Diversidad genética en Hidalgo	43
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
V.	JUSTIFICACIÓN	46
VI.	HIPÓTESIS	48
VII.	OBJETIVOS	49
7.1	Objetivo general	49
7.2	Objetivos específicos	49
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS	50
8.1	Contexto de la investigación	50
8.2	Tipo de estudio	52
8.3	Definición de variables	53
8.4	Criterios de inclusión y exclusión	54
8.4.1	Criterios de inclusión	54
8.4.2	Criterios de exclusión	54
8.5	Métodos	55
8.5.1	Selección de pacientes	55
8.5.2	Firma de consentimiento informado	55
8.5.3	Obtención de muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas e individuos sanos	56
8.5.3.1	Transporte de muestras sanguíneas	57
8.5.3.2	Almacenamiento de muestras sanguíneas	57
8.5.4	Extracción y purificación de ADN	58
8.5.4.1	Integridad de ADN	59
8.5.5	Cuantificación de ADN	61
8.5.6	Sistema de amplificación	61
8.5.6.1	Amplificación y secuenciación de ADN	63
8.6	Análisis estadístico	65
8.6.1	Cálculo de frecuencias alélicas	66
8.6.2	Poder de discriminación	66
8.6.3	Contenido de información polimórfica	66
8.6.4	Heterocigosidad	67
8.6.5	Equilibrio de Hardy-Weinberg	67
IX.	RESULTADOS	70
9.1	Tamaño de la muestra y muestreo	70
9.2	Integridad de ADN	71
9.3	Locus D18S51	74
9.4	Locus D21S11	77
9.5	Locus D7S820	80

9.6	Locus D5S818	83
9.7	Locus D8S1179	86
9.8	Equilibrio de Hardy-Weinberg	91
9.9	Resultados de los parámetros estadísticos	93
X.	DISCUSIÓN	97
10.1	Locus D18S51, alelo 18 del grupo control con mayor frecuencia alélica en comparación con la observada en el grupo problema (pacientes con enfermedad de Chagas)	98
10.2	Las diferencias entre las frecuencias alélicas observadas en el grupo control y el grupo problema para el marcador D21S11 sugieren una predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas	100
10.3	El Locus D7S820 presenta diferencias estadísticamente significativas en el grupo conformado por pacientes con enfermedad de Chagas y el grupo control	100
10.4	Locus D5S818	101
10.5	Locus D8S1179	102
10.6	Parámetros estadísticos forenses en pacientes con enfermedad de Chagas	103
XI.	CONCLUSIONES	106
XII.	PERSPECTIVAS	107
XIII.	REFERENCIAS	108
XIV.	ANEXOS	113
XIV.1	Consentimiento informado	113

## Resumen

La población de Hidalgo cuenta con una diversidad genética muy extensa, la cual no se ha identificado por medio del estudio de sus frecuencias alélicas. La predisposición a la adquisición de algunas enfermedades que presenta la población de Hidalgo se puede determinar por medio de la identificación de los alelos dominantes de sus habitantes. Tal es el caso de la enfermedad de Chagas, infección que se presenta en la mayor parte del país incluyendo Hidalgo y los casos reportados van en aumento a nivel tanto estatal así como nacional e internacional. En México se ha incrementado el uso de marcadores genéticos tipo “Short Tandem Repeats” o Repeticiones Cortas en Tandem para la determinación de frecuencias alélicas de una población, debido a que presenta un excelente poder discriminativo. En el presente trabajo se analizaron los alelos dominantes de 44 individuos nacidos en Hidalgo tomando este grupo como grupo control, así como las frecuencias alélicas de 44 pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas. Para este estudio se utilizaron los marcadores genéticos D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51 y D5S818. Se obtuvo el material genético para su análisis por medio de muestras sanguíneas de individuos sanos de diferentes municipios de Hidalgo, así como de pacientes con Chagas. Se extrajo el ADN de cada muestra y se realizaron ensayos de PCR con marcadores de microsatélites. Los genes fueron secuenciados y se realizó un análisis *in silico*. Finalmente, se realizó un análisis estadístico y con los resultados obtenidos se generó una base de datos. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en este estudio, la predisposición de los habitantes de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas no sólo podría depender de la interacción de la población con el insecto vector, sino que existe un factor genético que los hace más vulnerable a adquirir dicha enfermedad.

## **Abstract**

The population of Hidalgo has a very extensive genetic diversity, which has not been identified through the study of its allelic frequencies. The predisposition to the acquisition of some diseases presented by the population of Hidalgo can be determined by means of the identification of the dominant alleles of its inhabitants. Such is the case of Chagas' disease, an infection that occurs in most of the country, including Hidalgo, and reported cases are increasing at the state, as well as national and international levels. In Mexico, the use of genetic markers such as "Short Tandem Repeats" or Short Tandem Repeats has been increased for the determination of allele frequencies of a population due to its excellent discriminative power. In the present work, we analyzed the dominant alleles of 44 individuals born in Hidalgo taking this group as a control group, as well as the allelic frequencies of 44 patients diagnosed with Chagas disease. The genetic markers D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51 and D5S818 were used for this study. The genetic material was obtained for analysis by means of blood samples from healthy individuals from different municipalities of Hidalgo, as well as from patients with Chagas. The DNA was extracted from each sample. PCR assays were performed with microsatellite markers. The genes were sequenced and an in silico analysis was performed. Finally, a statistical analysis was performed and a database was generated with the results obtained. According to the results obtained in this study, the predisposition of the inhabitants of Hidalgo to acquire Chagas disease could not only depend on the interaction of the population with the vector insect, but there is a genetic factor that makes them more vulnerable to acquire said disease.

## **I. Introducción**

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad potencialmente mortal transmitida principalmente por la picadura del insecto triatómino, mejor conocido como chinche besucona. El parásito causante de la enfermedad (*Trypanosoma cruzi*) habita en las heces del insecto, al momento de picar a su víctima, éste se rasca muy cerca de la picadura, de esta manera arrastra al parásito hacia la lesión causada ocasionando que el parásito pueda ingresar al torrente sanguíneo.

Se le considera como una enfermedad endémica de América latina aunque, debido a los procesos migratorios de la población se reportan casos en todo el mundo convirtiéndola en una enfermedad cosmopolita. Los principales síntomas de esta enfermedad comienzan con la aparición del chagoma que es una lesión que se presenta en el área donde ocurrió la picadura, posteriormente se presenta un edema bpalpebral izquierdo que es la hinchazón del párpado superior izquierdo, este último síntoma es muy característico de la enfermedad y se presenta aproximadamente a los 15 días después de que ocurrió el contagio. Años después, comienza la segunda fase de la enfermedad, en la cual se desarrollan fallas cardíacas, digestivas y en el sistema nervioso periférico. Durante esta fase el corazón es el órgano que presenta una mayor afectación como insuficiencias cardíacas progresivas y cardiomegalias.

De acuerdo a las últimas cifras reportadas, los casos de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas van en aumento posicionando a México como país endémico de la enfermedad y a Hidalgo entre los primeros cinco estados más afectados con la enfermedad.

Estudios previos a esta investigación se enfocan en determinar si existe un riesgo a adquirir la enfermedad de Chagas basándose en la interacción entre el insecto y los habitantes de una población en particular. En el presente estudio, se determinará si existe una predisposición genética en la población de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas.

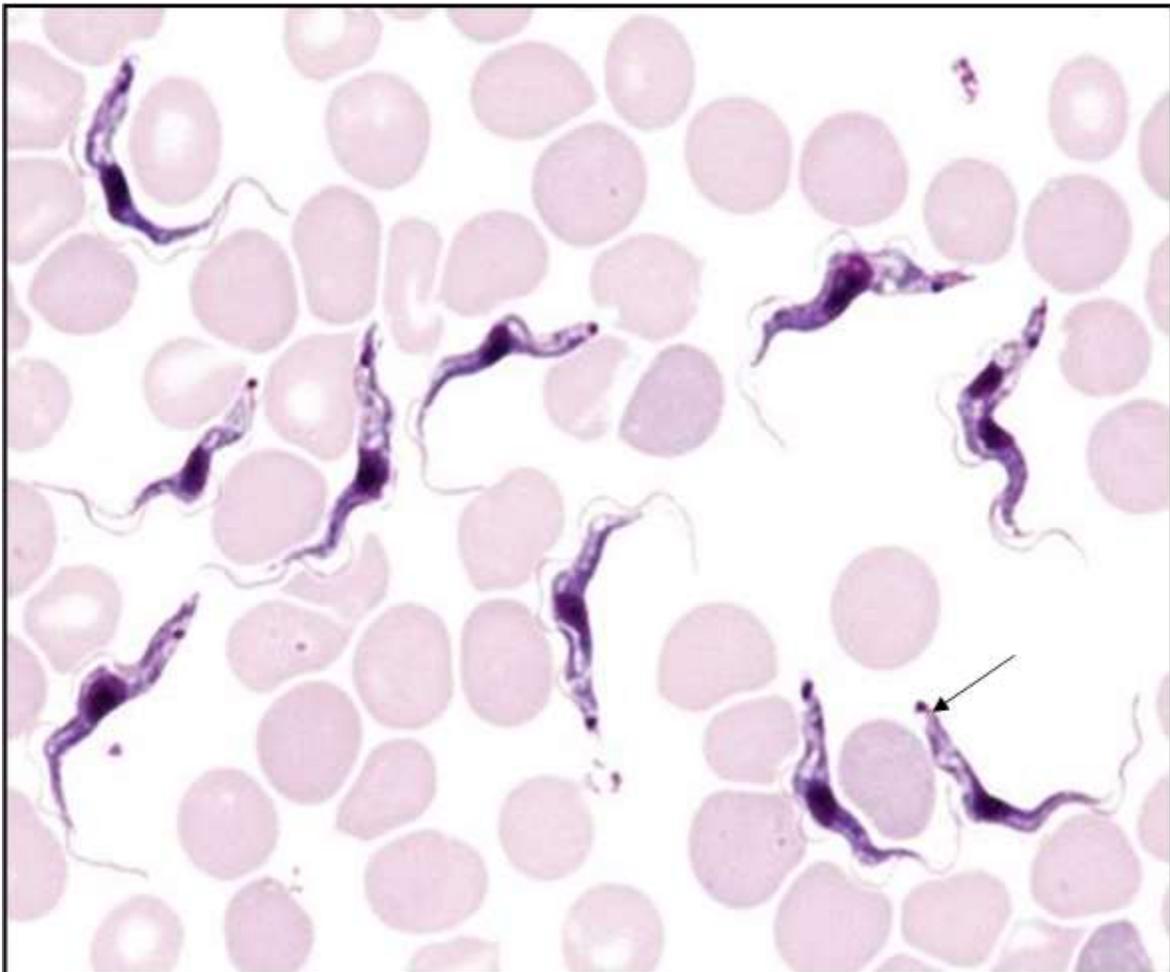
El uso de microsatélites tipo short tandem repeat (STR's) se ha expandido a nivel mundial rápidamente, debido a que demuestra ser un método muy eficiente y confiable para la determinación de frecuencias alélicas de una población.

Por otro lado, el uso de bases de datos que contengan las frecuencias alélicas de una población en específico es de gran utilidad en estudios de identificación de individuos, pruebas de paternidad y de análisis forenses. Uno de los objetivos principales de este trabajo es contar con una base de datos que contenga esta información genética de la población de Hidalgo para facilitar este tipo de investigaciones.

## II. Antecedentes

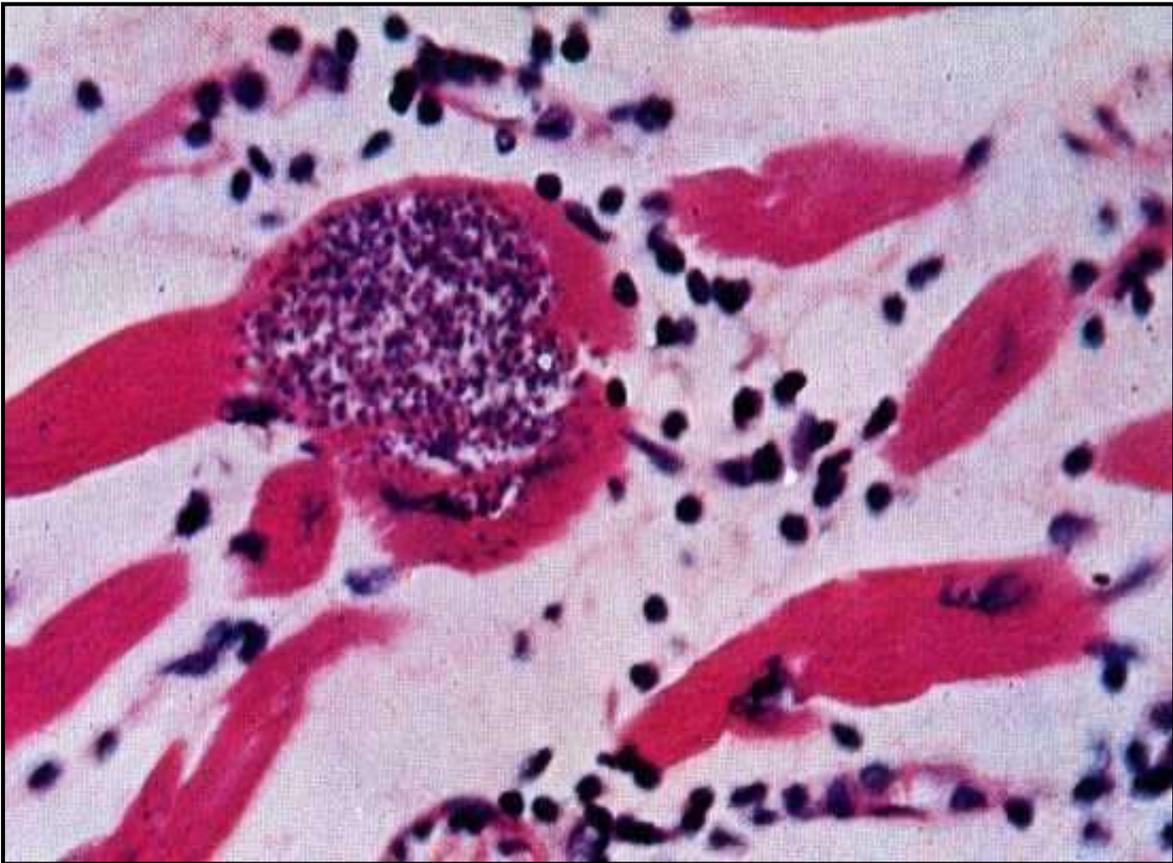
### 2.1 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular perteneciente a la clase Zoomastigophora, orden: Trypanosomatida, familia: Trypanosomatidae, género: *Trypanosoma*. Se caracteriza por poseer un solo flagelo y una sola mitocondria, en la cual se encuentra su genoma ordenado y compactado en una región denominada cinetoplasto. (Fig. 1).



**Figura 1.** Muestra sanguínea de un paciente infectado con enfermedad de Chagas donde se observa el parásito *Trypanosoma cruzi*. Fuente: [accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1507&sectionid=102897](https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1507&sectionid=102897)

A lo largo de su ciclo de vida presenta diferentes estadios: amastigote (Fig. 2), el cual posee una forma esférica u ovalada y es la etapa donde el parásito se divide de manera intracelular en los tejidos del huésped formando así pseudoquistes; epimastigote (Fig. 3), en donde el parásito presenta una forma alargada y posee un flagelo libre, esta forma celular se encuentra principalmente dentro del tracto digestivo del vector y finalmente tripomastigote (Fig. 4), los cuales presentan un flagelo y una membrana ondulante a lo largo del cuerpo, se localizan en la sangre del huésped y es la forma infectante de la Enfermedad de Chagas.<sup>1,2</sup>



**Figura 2.** Muestra sanguínea de un paciente diagnosticado con enfermedad de Chagas, se observa un parásito de *Trypanosoma cruzi* en su fase amastigote. Fuente: [www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/minoprio/tropical/chagas/chapter3.html](http://www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/minoprio/tropical/chagas/chapter3.html)



**Figura 3.** Muestra sanguínea de un paciente diagnosticado con enfermedad de Chagas, en donde se observa el parásito de *Trypanosoma cruzi* en fase de epimastigote. Fuente: [www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/minoprio/tropical/chaga/chapter3.html](http://www.pasteur.fr/recherche/unites/tcruzi/minoprio/tropical/chaga/chapter3.html)



**Figura 4.** Muestra sanguínea de un paciente diagnosticado con enfermedad de Chagas donde se observa un parásito de *Trypanosoma cruzi* en fase de tripomastigote. Fuente: [www.medchem.com/Para/Prob%20of%20Month/Prob%20of%20Month%2013%20January%2002.htm](http://www.medchem.com/Para/Prob%20of%20Month/Prob%20of%20Month%2013%20January%2002.htm)

A nivel genético *Trypanosoma cruzi* se divide en dos grandes grupos: *Trypanosoma cruzi* I y *Trypanosoma cruzi* II, el cual se divide a su vez en cinco subgrupos: *Trypanosoma cruzi* IIa, IIb, IIc, IId y IIe. Este último grupo (*Trypanosoma cruzi* II) se reconoce como el más relacionado con casos crónicos de la enfermedad de Chagas en Sudamérica.<sup>2, 3</sup>

### 2.1.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* se divide en dos principales etapas. La primera tiene lugar en los mamíferos infectados e inicia cuando el triatómino o chinche transmisora pica y defeca cerca de la herida que causó. Los tripomastigotes metacíclicos son transmitidos por medio de las heces del insecto y entran al torrente sanguíneo atravesando las membranas mucosas del hospedero al momento de que éste se rasca la herida e infecta el área circundante. Cuando entra en las células del hospedero, se convierte en amastigote. En esta etapa el parásito se reproduce por mitosis. Después de reproducirse y aumentar de número, se forman pseudoquistes. El amastigote vuelve a su forma de tripomastigote y rompe la célula para liberarse e infectar a otras células vecinas e iniciar nuevamente con el ciclo de vida del parásito.

La segunda etapa tiene lugar en el intestino del insecto vector. Cuando el triatómino pica a un hospedero infectado, los tripomastigotes pasan a través del torrente sanguíneo. Dentro del intestino del insecto se transforman en epimastigotes y constituyen una segunda etapa reproductiva. Después de reproducirse mediante mitosis, los epimastigotes entran al recto y se convierten en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son evacuados mediante las heces y así pueden infectar a un nuevo hospedero repitiendo el ciclo. Durante esta fase los parásitos se multiplican por medio de fisión binaria para después de unos días romper las células tisulares dando origen al tripomastigote. Esta forma del parásito es visible en el torrente sanguíneo<sup>4</sup> (Fig. 5).

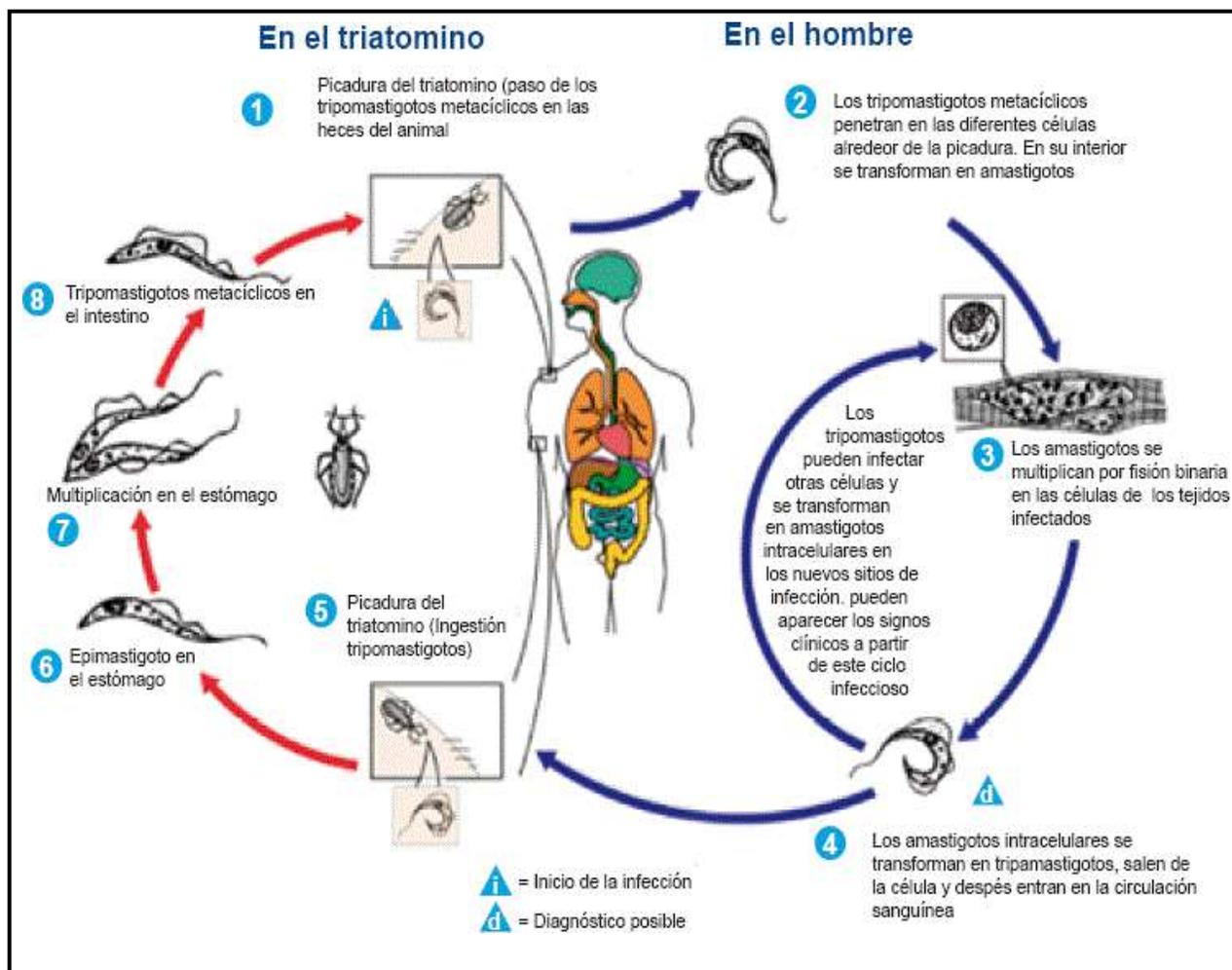


Figura 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: <http://www.revistasbolivianas.org.bo/>

### 2.1.2 *Modo de transmisión de Trypanosoma cruzi*

La transmisión de *Trypanosoma cruzi* al humano se da a través de la picadura del insecto hematófago de la subfamilia Triatominae mejor conocido como “chinche besucona.”

Se reconocen cinco modos de transmisión de la enfermedad:

- Transmisión vectorial. Es el modo de infección más común. Se produce a través de la picadura del triatómino. En algunas ocasiones, el parásito puede pasar al hospedero por medio de las mucosas si las heces del parásito se han depositado cerca de las mismas.
- Transmisión vertical. Es la segunda causa de transmisión más frecuente y se da de madre a hijo. Si una mujer presenta la enfermedad de Chagas durante el embarazo, puede transmitirla al bebé. Los hijos de madres diagnosticadas con Chagas deben realizarse pruebas de laboratorio que descarten o confirmen la presencia de la infección.
- Transmisión por transfusión sanguínea y sus derivados. Es el modo de transmisión menos probable, ya que en la actualidad se establecen mecanismos de control en los bancos de sangre y en procesos de donación de órganos, aun así se llegan a presentar casos de este modo de transmisión principalmente en países subdesarrollados.
- Transmisión por vía oral. La ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con heces del insecto son un foco de transmisión de la enfermedad de Chagas. Este modo de transmisión es poco frecuente y se presenta principalmente en países considerados como endémicos del triatómino.

- Transmisión por contacto directo con el parásito. Se presenta en individuos que tienen un contacto directo al manipular muestras que contengan el parásito o trabajen directamente con el insecto.<sup>4</sup>

En México existen pocos casos publicados de transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea, aunque se han documentado 4 casos estimando que se presenten anualmente 1800 casos de transmisión por esta vía.<sup>5</sup>

## 2.2 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en 1907 por el médico investigador Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil, al observar una plaga de insectos hematófagos en casas rurales en el Amazonas. Al analizar estos insectos, descubre en sus intestinos a un protozoo flagelado que también observó en la sangre de los monos titi (*Callithrix penicillata*) de la región.<sup>4</sup> Una vez que aisló al parásito, lo cultivó y reprodujo la infección en mamíferos para observar el curso de la enfermedad en animales de laboratorio. La enfermedad de Chagas la pudo observar y describir con el caso de Berenice, una paciente de dos años de edad, quien presentaba fiebres, hepato y esplenomegalia; con la sospecha de que se tratara de malaria, Carlos Chagas examina el frotis sanguíneo y encuentra el mismo protozoo flagelado observado en los triatóminos.<sup>5, 6</sup> Berenice muere hasta los 82 años siendo portadora de la infección y sin presentar ninguna patología propia de la enfermedad al momento de su deceso.<sup>7</sup> El caso de Berenice fue el primer caso de tripanosomiasis descrito a nivel mundial.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis es una infección que causa principalmente cardiopatías, megaesófago o megacolon. Esta enfermedad afecta principalmente a mamíferos. En México, los primeros casos reportados de la enfermedad de Chagas fueron los de dos pacientes procedentes de Oaxaca diagnosticados con la enfermedad y estudiados por el Dr. Luis Mazzoti en 1940. No fue sino hasta 1980 cuando el Dr. R. S. Goldsmith relacionó la incidencia de la enfermedad de Chagas con las viviendas rurales y el entorno en

el que se desarrollaban los pobladores, las cuales resultan favorecedoras para la proliferación del insecto.<sup>8</sup>

### 2.2.1 Características de la Enfermedad de Chagas

Se pueden distinguir dos fases dentro de la enfermedad de Chagas: la *fase aguda*, la cual no suele presentar síntomas y pasa desapercibida en el 90% de los casos, algunos síntomas que pueden presentarse lo hacen hasta el sexto día después de la adquisición de la enfermedad. Los síntomas que presenta esta fase son inflamación en el área en donde el insecto picó al hospedero, aparición de edemas o chagomas, edema bpalpebral unilateral, en algunos casos se presenta fiebre, parasitemia, linfadenopatías, vómitos y diarrea<sup>3</sup>. La fase aguda se presenta en el 5% de los pacientes con Chagas y tiene una duración aproximada de 2 a 3 semanas hasta 4 meses. Los primeros síntomas se presentan a los diez días del contagio.<sup>8,9</sup>

En esta fase se presenta además el signo de Romana-Mazza o edema bpalpebral izquierdo, el cual es una lesión nodular subcutánea de color violeta. Los síntomas más frecuentes son fiebres poco elevadas, mialgias, artralgias y hepato y/o esplengomegalia. Cerca del 1% de los casos presenta complicaciones como meningoencefalitis, miocarditis o pericarditis, las cuales tienen desenlaces fatales en niños y ancianos.



**Figura 6.** Signo de Romaña- Mazza. Fuente: <http://archive.is/D3F0Y·selection-1405.52>

La fase crónica dura entre 5 y 20 años, es asintomática con parasitemia muy baja. Después de esta fase, se presenta la fase crónica con los primeros síntomas de la enfermedad de Chagas, en la cual se desarrollan fallas cardíacas, digestivas y en el sistema nervioso periférico.<sup>10</sup> Durante esta fase el corazón es el órgano que presenta una mayor afectación, como insuficiencias cardíacas progresivas y cardiomegalias (Fig. 7).<sup>11,12</sup>

Con los trabajos de Carlos Chagas junto con el Dr. Eurico Villela realizados entre los años 1911 y 1922, se reconocieron los síntomas de la enfermedad, donde se identificaron como una característica típica de la enfermedad cardiopatías, alteraciones del ritmo o arritmias y bloqueos de rama y muerte súbita.<sup>13, 14</sup> Alrededor del 70% de los infectados permanecen en este estado durante toda su vida.<sup>6</sup>



**Figura 7.** Cardiopatía chagásica crónica. Fuente: American Journal on Medicine (2015)

### *2.2.2 Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas*

La enfermedad de Chagas se consideraba una enfermedad endémica de América Latina hasta hace unos años cuando empezó a presentarse como un problema de salud pública en Estados Unidos, donde actualmente se reportan 300,000 casos y algunos países europeos con 80,000 pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas, posiblemente por la migración de habitantes de zonas endémicas. Algunos países donde también se han reportado casos de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas son Canadá con 5,500 casos reportados, Australia con 1,500 y Japón con 3,000 casos.<sup>8</sup>

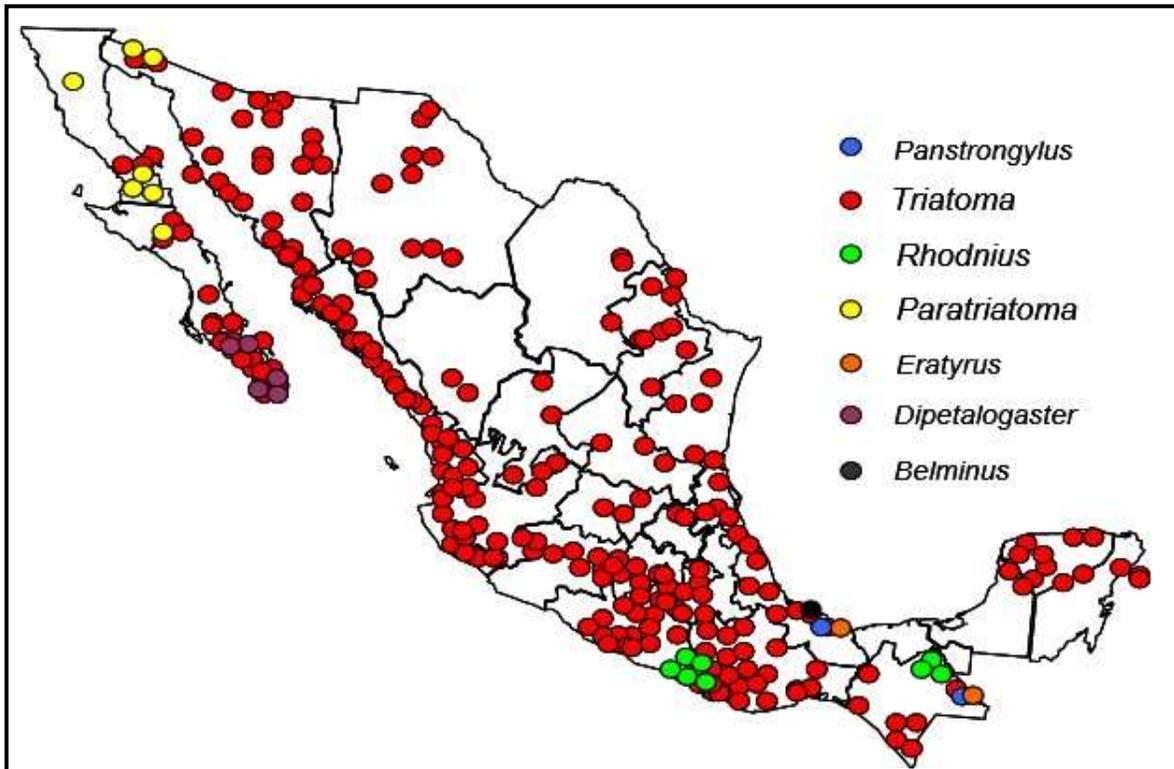
La Organización mundial de la Salud (OMS) reporta que en América Latina existen alrededor de 110,000,000 de individuos en riesgo de infección distribuidos en 21 países: Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Perú, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Colombia, Guyana Francesa, Guyana, Suriname, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Belice, Guatemala y México.<sup>16</sup>

Los movimientos migratorios han convertido en riesgo mundial la transmisión de la enfermedad de Chagas. Actualmente, se le considera emergente en países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón, Francia, España, Bélgica, Portugal, Suiza, Gran Bretaña, Irlanda, Italia, Alemania, Austria, Croacia, Dinamarca, Luxemburgo, Noruega, Rumania y Suecia (Fig 8).<sup>15, 16</sup>



**Figura 8.** Casos estimados de enfermedad de Chagas en el mundo.  
 Fuente: [http://www.wikicardio.org.ar/wiki/Chagas:\\_una\\_enfermedad\\_sin\\_fronteras](http://www.wikicardio.org.ar/wiki/Chagas:_una_enfermedad_sin_fronteras)

En México se reconocen 32 especies, de las cuales 13 son de importancia epidemiológica por su localización geográfica, doméstica e infección natural por *T. cruzi*. (Fig. 9).



**Figura 9.** Distribución geográfica de las trece especies de triatóminos con mayor importancia epidemiológica en México. Fuente: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/42504/GuzmanGomezDaniel.pdf;jsessionid=F3B891C382CBE4A1C26E7BECCF3E1FFB?sequence=2>

En México la notificación de casos de enfermedad de Chagas presenta una tendencia ascendente hasta el 2015, año en el cual se presentaron aproximadamente mil 100 casos; después, en 2016, se presentaron mil y en 2017, 900 casos. Durante 2018 se tienen registrados 150 casos hasta la semana epidemiológica número 14. De los casos nuevos de la enfermedad de Chagas por entidad federativa, para 2017 las mayores tasas del país se registraron en Yucatán (4.0), Oaxaca (2.4) e Hidalgo (2.1). La tasa de incidencia nacional es de 0.7 por cada 100 mil habitantes.<sup>15</sup>

## 2.3 ADN

Los seres humanos se componen de billones de células teniendo en cada una de ellas 46 cromosomas; 23 heredados por la madre y 23 por el padre, a excepción de los gametos o células sexuales. El ADN es una biomolécula, en la cual se encuentra la información genética de cada ser vivo, su principal función es la de almacenar información genética, la cual será heredada y transmitida de generación en generación. Otra función principal del ADN es la construcción de proteínas y ARN imprescindible para el buen funcionamiento del organismo.<sup>20</sup>

El ADN es una macromolécula de doble hélice, cuya estructura fue descubierta en 1953 por Watson y Crick. Estas cadenas complementarias de desoxirribonucleótidos son capaces de producir copias complementarias de sí mismas por medio de un proceso denominado replicación; de esta manera se asegura que el material genético se herede de generación a generación de manera íntegra y fiel.<sup>22</sup>

Los ácidos nucleicos fueron descritos por primera vez en 1869 por Friedrich Miescher, quien obtuvo del núcleo celular una macromolécula no identificada a la cual llamó nucleína, la cual posteriormente se conocería como ácido nucleico. A principios del siglo XX el médico alemán Albrecht Kossel demostró la existencia de dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).<sup>23</sup> Los ácidos nucleicos controlan los procesos vitales de todos los seres vivos. El ADN contiene a los genes y el ARN es el intermediario en la actividad del gen.<sup>24</sup>

Cada eslabón de ADN está conformado por cuatro nucleótidos que difieren en sus bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina). La información genética consiste en el orden preciso de estos cuatro diferentes nucleótidos a través de la cadena de ADN.

### 2.3.1 Cromosomas

La palabra cromosoma proviene del griego *khroma* “color” y *soma* “cuerpo” cuerpo con color”. Este término fue acuñado por Wilhelm von Waldeyer en 1888. Los cromosomas son corpúsculos generalmente filamentosos presentes en el núcleo de las células y aparecen al momento de la mitosis. Durante la división celular, tanto mitosis como meiosis, el cromosoma se encuentra en forma de X debido al grado de compactación y duplicación.<sup>21</sup> Cada cromosoma es una molécula de ADN asociada a proteínas, las cuales contienen a los genes.

### 2.3.2 Genes

Se define como gen a la unidad de información en un locus de ADN. Es la unidad de herencia molecular más pequeña de almacenamiento y transmisión de ADN. Un gen es un fragmento de material genético que codifica una proteína funcional.<sup>23</sup> En los cromosomas se organiza la cromatina, la cual lleva toda la información genética de los organismos y está constituida por ADN asociado a proteínas especializadas llamadas histonas. Los cromosomas presentan una forma y tamaño característico. Cada cromosoma tiene una región condensada llamada centrómero.<sup>25</sup> La eucromatina es una forma de la cromatina ligeramente compactada que posee una gran concentración de genes y participa en la transcripción del ADN a ARN.<sup>26</sup> La cromatina que no participa en la transcripción se transforma en heterocromatina, la cual una de sus funciones es la de proteger a los genes.

La heterocromatina se divide en facultativa, la cual es cromatina que puede presentarse como eucromatina transcripcional y la constitutiva, la cual su función es meramente estructural, aunque recientes estudios han demostrado que la heterocromatina constitutiva tiene un gran valor y riqueza génica.<sup>27</sup>

### 2.3.3 Genoma

El ADN es un polinucleótido constituido por dos cadenas antiparalelas de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente, dispuestos de una forma complementaria y adoptando una estructura enrollada de doble hélice<sup>28</sup> y conteniendo toda la información genética del individuo. Al conjunto de toda la información presente en las células se le llama genoma. De acuerdo a su localización, se identifican dos tipos de genomas: el nuclear y el mitocondrial.<sup>29</sup>

El ADN nuclear proporciona gran parte de la información genética de un individuo. El ADN nuclear está conformado por dos cadenas o hebras de nucleótidos unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno formando una doble cadena.<sup>30</sup> Cada nucleótido se compone de un grupo fosfato, una molécula de azúcar, desoxirribosa y una base nitrogenada.<sup>33</sup>

El ADN mitocondrial, como lo dice su nombre, se encuentra en las mitocondrias y posee una estructura circular con regiones codificantes y una región hipervariable utilizada frecuentemente en pruebas de identificación humana.<sup>34</sup> El ADN mitocondrial es transmitido únicamente por la vía materna y posee un grado de conservación mayor en comparación con el ADN nuclear en tejidos de huesos, cabello y dientes.<sup>35</sup>

## 2.4 Alelos

El término alelo surge de la palabra alelomorfo, que quiere decir: en formas alelas, es decir, que se presenta de diferentes maneras dentro de una población. Es cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen y se diferencian en su secuencia y puede manifestar modificaciones concretas de la función de dicho gen. Produce variaciones en características heredadas.<sup>27</sup>

#### *2.4.1 Frecuencias alélicas*

Se define como frecuencia alélica a la proporción de cada alelo en un locus dado en una población específica. La suma de las frecuencias alélicas de una población siempre es igual a uno. Las frecuencias alélicas son de gran interés en cuanto a la transmisión genética de una población.<sup>22, 24</sup>

#### *2.4.2 Alelos dominantes*

Un alelo dominante es el que se manifestará siempre por encima de los demás alelos en un fenotipo. Los alelos dominantes se presentan de manera visible en las características físicas de un individuo.

#### *2.4.3 Alelos recesivos*

Por otro lado, un alelo recesivo no se manifestará en el individuo en presencia de un alelo dominante, sin embargo, más adelante podría heredarse y manifestarse en futuras generaciones.<sup>27</sup>

#### *2.4.4 Alelos polimórficos*

Los alelos polimórficos se refiere a la ocurrencia de alelos múltiples en un locus, donde al menos dos alelos aparecen con una frecuencia mayor a 1% en la población. Es cuando más del 1% de la población presenta alelos en un determinado loci.<sup>25</sup>

#### *2.4.5 Polimorfismo genético*

El primer locus polimórfico de ADN identificado fue descubierto por Wyman y White en 1980, este hallazgo fue una pauta fundamental para la identificación genética de individuos.<sup>35, 36</sup> Una gran cantidad de genes se caracterizan por tener un número de alelos común o constante, lo cual permite clasificar a los individuos de una población dentro de fenotipos distinguibles. Gran cantidad de genes se caracterizan por tener un número relativamente común de alelos, que permiten clasificar a los miembros de una población originada naturalmente dentro de fenotipos distinguibles.

El polimorfismo genético se define cuando un mismo gen tiene múltiples alelos y al menos dos tienen frecuencias mayores al 1% en la población y la frecuencia de heterocigotos en la población es de al menos 2%. A los alelos con una frecuencia menor a 1% se les conoce como variantes raras.<sup>26</sup>

Los polimorfismos genéticos se utilizan como marcadores genéticos que permiten distinguir el patrón de herencia de un gen en estudios familiares. Tienen aplicación práctica en la localización y mapeo de genes en cromosomas individuales mediante estudios de análisis de ligamento, el diagnóstico presintomático y prenatal, así como en la detección de portadores de enfermedades genéticas, evaluación del riesgo en personas con predisposición a desórdenes como enfermedades coronarias, cáncer y diabetes, estudios de paternidad, forense y casos de inmigración y para establecer la compatibilidad donador- receptor en trasplantes de tejidos y órganos.<sup>40</sup>

## **2.5 Locus**

### *2.5.1 Definición de locus*

Se define locus (o loci en plural) a la localización fija de un gen o un marcador en el cromosoma. Es utilizado en la identificación de posiciones de interés científico en determinadas secuencias.<sup>27</sup> En la especie humana existen aproximadamente 50 mil genes que codifican, a través del ARN, proteínas. Estos genes codificadores de proteínas representan aproximadamente el 10% del genoma. Como se mencionó anteriormente, el resto son de secuencias repetitivas que tienen función estructural.<sup>36</sup> Por lo tanto, es la variabilidad de este restante, las regiones polimórficas, que se utiliza en los análisis forenses del ADN.

### *2.5.2 Técnicas para la identificación de locus*

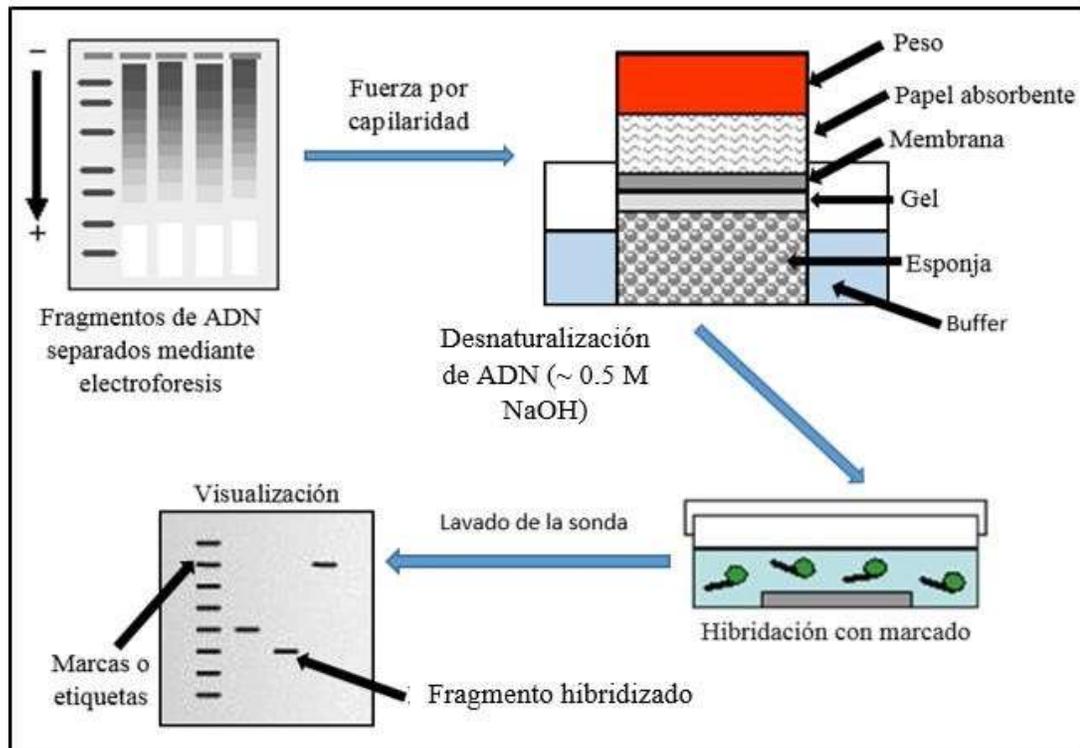
La identificación con muestras genéticas se basa principalmente en la presencia de locus polimórficas o hipervariables. El ADN compuesto por largas cadenas formadas por millones de pares de bases, tiene algunas zonas que se repiten de forma secuencial llamadas Repeticiones Cortas en Tándem o Short Tándem Repeats (STR's).<sup>37</sup>

Existen distintas técnicas para la identificación de uno o varios locus, las cuales se pueden utilizar para la identificación de individuos y poderlos relacionar con otros. Para realizarlas se debe de separar el material genético de la muestra biológica (sangre, saliva, semen, cabello, etc.) obtenida del individuo, esto mediante la ruptura del núcleo de la célula para la liberación del ADN.<sup>37</sup>

#### *2.5.2.1 Hibridación con sondas (Southern blot)*

Inicialmente, la manera de estudiar estos locus era mediante una técnica denominada Hibridación con sondas o southern blot, la cual se representa en la Figura 10.

De acuerdo a la descripción realizada por Butler en 2005, en esta técnica, después de la separación del material genético mediante electroforesis, los fragmentos de ADN se desnaturalizan y son separados. Las cadenas de ADN simples son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y se fijan en la misma por medio de calor. Después empieza la fase de pre hibridación con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudieran existir en la membrana. Se realiza el marcaje de la sonda por medio de nucleótidos radioactivos, comienza la hibridación de la sonda marcada y desnaturalizada y su lavado para eliminar el exceso de sonda. Se revela la placa radiográfica y se interpretan los resultados.<sup>37</sup>

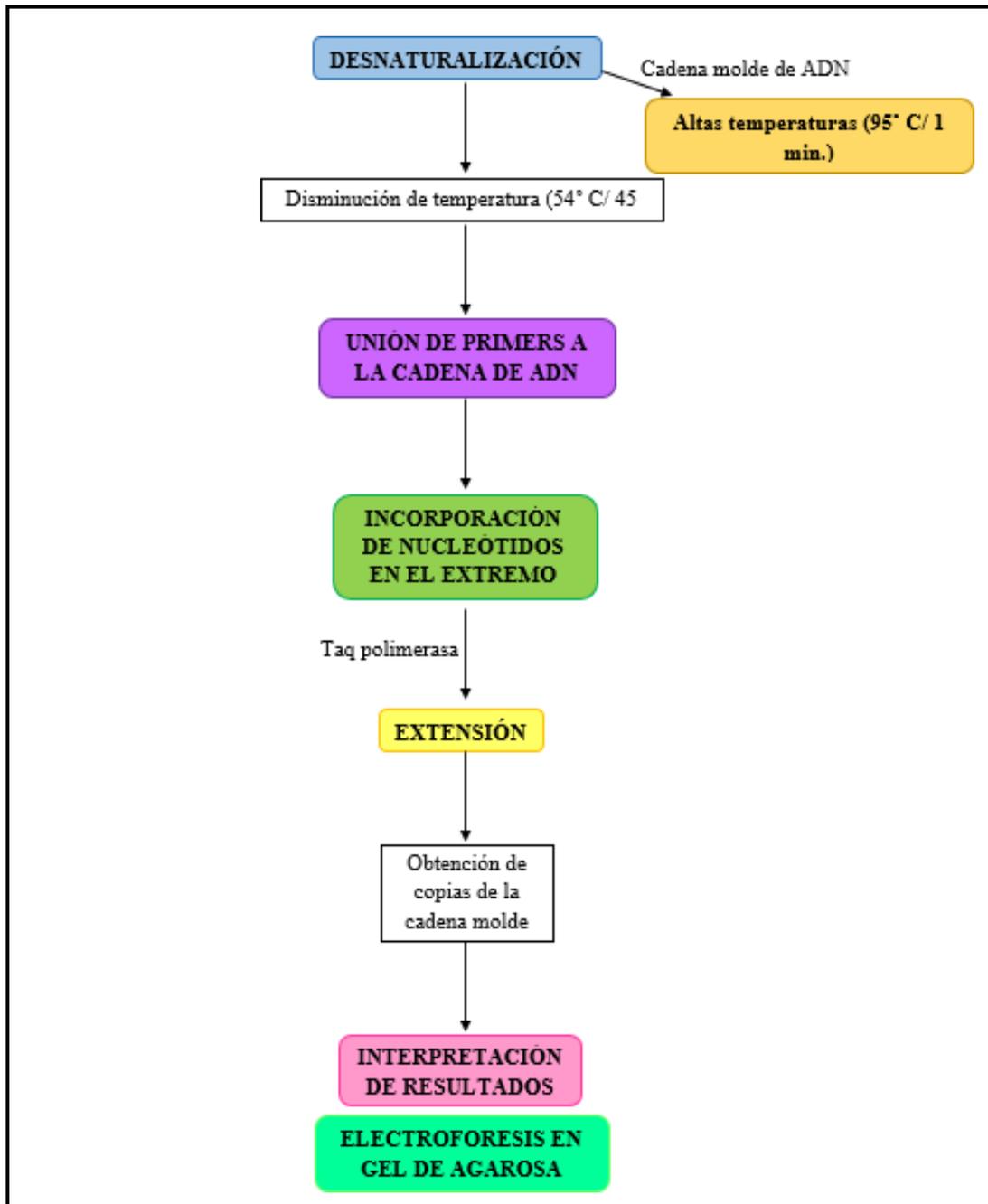


**Figura 10.** Hibridación con sondas (Southern blot)

### 2.5.2.2 Análisis por la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Otra de las técnicas más utilizadas para la identificación de locus, es la de análisis por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Fig. 11), la cual permite amplificar más de un millón de veces el ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de la secuencia de sus nucleótidos. Para esta técnica se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos llamados “primers”, los cuales actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* del ADN.

En esta técnica el ADN molde se debe encontrar en forma de cadena sencilla (desnaturalización), lo cual se consigue aplicando elevadas temperaturas que rompen los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas y se produce su separación. Posteriormente se reduce la temperatura para producir la unión de los primers a las secuencias del ADN que se pretende amplificar. En la siguiente fase se incorporan nucleótidos en el extremo 3' del primer mediante una enzima llamada taq polimerasa y se repite por varios ciclos.<sup>37</sup>



**Figura 11.** Reacción en cadena de polimerasa.

### 2.5.2.3 *Biochips o microarrays*

Las técnicas de análisis genético se encuentran en continua actualización. Uno de los nuevos métodos de análisis es el uso de biochips o microarrays, los cuales surgen de la combinación de técnicas microelectrónicas empleadas en la fabricación de microprocesadores informáticos y material biológico. Estos biochips son similares a la de los chips informáticos. En los biochips existen unas láminas de vidrio en las que se depositan cadenas de ADN. Estas láminas poseen grupos reactivos a los que se unen los nucleótidos.<sup>37</sup>

## **2.6 Genética de Poblaciones**

Se conoce como Genética de Poblaciones a la rama de la Genética que se encarga de estudiar la distribución de los genes en las poblaciones, así como la manera en que se mantienen o cambian sus frecuencias tanto alélicas como genotípicas. Es el estudio de la composición genética de un individuo, así como de la población entera y los cambios de la misma a través de las generaciones para establecer las variaciones de distintos locus. La genética de poblaciones trata de explicar las posibles causas de estas variantes y llegar a establecer un modelo aplicable para todo ser vivo.<sup>38</sup>

La diversidad genética tiene su origen en las mutaciones, estas diferencias genéticas entre las poblaciones se produce como resultado de la selección de mutaciones como respuesta a condiciones ambientales, mutaciones específicas, adaptación para la perpetuidad de la especie y la reproducción aislada entre los grupos.<sup>39</sup> La especie humana se conforma por alrededor de cinco mil millones de individuos, los cuales se dividen en tres grandes grupos: caucásicos, afroamericanos y asiáticos. Estos tres grandes grupos poseen características que se distinguen claramente, las cuales se denominan razas; cada una formada por numerosos subgrupos poblacionales con diferencias genéticas entre sí. A estos grupos se les denominan grupos étnicos.

El establecimiento de diferencias genéticas entre razas y poblaciones es el resultado de la selección de mutaciones dadas en respuesta a condiciones ambientales del entorno, a la

perpetuidad de mutaciones consideradas como neutrales y al grado de reproducción aislada entre los grupos.

Existen diferencias genéticas entre poblaciones en sus frecuencias alélicas, tanto para genes causantes de enfermedades, así como para marcadores genéticos selectivos, por ejemplo los grupos sanguíneos, los cuales son muy significativos para la determinación de riesgos de recurrencia de enfermedades genéticas en poblaciones, polimorfismos proteicos y de ADN, utilizados como importantes marcadores de la evolución humana.<sup>40</sup>

### *2.6.1 Equilibrio génico*

El equilibrio génico establece que la composición genética de una población permanecerá en equilibrio siempre y cuando no actúe la selección natural u otro factor que contribuya a alguna mutación.<sup>37</sup>

### *2.6.2 Poblaciones en equilibrio*

Una población se considera en equilibrio cuando tiene una tasa de crecimiento nula, aunque existan cambios importantes en cuanto a sus índices de natalidad, mortandad, inmigración, así como la distribución de edad entre los dos siempre y cuando el número de población nueva sea equivalente al número de población cesante. Una población está en equilibrio cuando los alelos polimórficos mantienen su frecuencia en la población a través de generaciones.

De acuerdo a lo expuesto por Hardy y Weinberg en 1908, para que una población se considere en equilibrio, ésta debe ser infinitamente grande y los apareamientos al azar; no debe existir selección, es decir, que cada genotipo debe poder sobrevivir bien como cualquier otro; no debe existir flujo génico, debe tratarse de una población cerrada donde no haya migración, y por último, no debe haber mutaciones.<sup>3</sup>

### 2.6.3 Ley de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg establece que en una población que cumple con lo mencionado anteriormente, las frecuencias génicas o genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra; una vez alcanzado este equilibrio, un loci autosómico se alcanza tras una generación. Mediante esta ley es posible calcular las frecuencias esperadas de los genotipos y fenotipos de la progenie.<sup>41</sup>

### 2.6.4 Poder de discriminación

Es la probabilidad de que dos individuos no relacionados puedan estar diferenciados genéticamente mediante el análisis de uno o varios marcadores. Depende del número de loci analizados, de las variables alélicas encontradas y frecuencias de cada locus en cada población.<sup>42</sup>

$$PD = 1 - PI$$

Donde PI= Probabilidad de coincidencia aleatoria

### 2.6.5 Probabilidad de coincidencia aleatoria

Es la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar tendrán un genotipo idéntico en el locus sometido a prueba, en otras palabras, es el número de individuos que podrán ser examinados antes de encontrar el mismo patrón de ADN en un individuo seleccionado aleatoriamente.<sup>42</sup>

$$\text{Probabilidad de coincidencia aleatoria} = PI = \sum_{i=1}^n x_i^2$$

### 2.6.6 Heterocigosidad

Es la proporción de individuos heterocigotos que se espera en la población. Una alta heterocigosidad significa que existe más diversidad alélica y por lo tanto hay una menor probabilidad de coincidencia en muestras.<sup>42</sup>

$$\text{Heterocigosidad (H)} = 1 - \text{Homocigosidad} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

### 2.6.7 Índice de contenido polimórfico

Refleja la capacidad de deducir el origen parental de cada uno de los alelos del genotipo en la descendencia en un locus particular.<sup>42</sup>

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - (\sum_{i=1}^n P_i^2)^2 + \sum_{i=1}^n P_i^4$$

### 2.6.8 Número efectivo de alelos

Hace referencia a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación. Esta medida indica el número de alelos esperados en cada locus de una determinada población, y es la inversa de la homocigosidad esperada de un locus.<sup>42</sup>

$$\text{Número efectivo de alelos (n}_e\text{)} = \frac{1}{\text{Homocigosidad}} = \frac{1}{h}$$

## 2.7 Microsatélites

Desde la aparición de la PCR se han desarrollado una serie de técnicas utilizadas para medir la variabilidad genética en los individuos y poblaciones. Una de estas técnicas más utilizadas es el uso de marcadores genéticos, la cual se basa en la clonación y secuenciación de pequeños fragmentos de ADN, mientras que otros se basan en la detección de polimorfismos al azar. Los microsatélites son secuencias de ADN, en las cuales un fragmento se repite de manera consecutiva.<sup>42</sup>

Se encuentran en zonas no codificantes de la cadena de ADN. Son neutros y poseen una alta tasa de mutación, por lo que son muy polimórficos. Debido a que los microsatélites se encuentran distribuidos a lo largo del genoma, su presencia se ha asociado a enfermedades. El uso de microsatélites ha tenido un alto impacto en el estudio de la genética de animales y plantas, involucra la detección de fragmentos específicos de ADN y proporciona la medida de los alelos en cada una de las regiones.<sup>43</sup>

Mediante el uso de microsatélites se aumentan las posibilidades de obtener resultados positivos de ADN cuando está degradado, esta ventaja es de gran importancia en estudios de Criminalística, ya que las muestras biológicas utilizadas han estado en contacto con diversos factores externos, como pueden ser el calor o la humedad que favorecen el crecimiento bacteriano. El avance tecnológico y científico en marcadores genéticos moleculares ha permitido el desarrollo de la Genética Forense para la identificación de personas, restos cadavéricos, análisis de vestigios biológicos de interés criminal, investigación de paternidad y las variabilidades genéticas de la población.<sup>44</sup>

### 2.7.1 *STR's: Repeticiones Cortas en Tándem (Short Tandem Repeats)*

Los Short Tandem Repeats son secuencias de ADN muy cortas de 2 a 5 pares de bases, las cuales se repiten varias veces y de manera consecutiva. El análisis de estas secuencias cortas ha permitido esclarecer casos de identificación humana y la realización de mapeos genéticos debido a su elevado polimorfismo, su tasa de mutación baja, su tamaño pequeño y ubicación cromosómica establecida. Varios de estos marcadores pueden ampliarse mediante PCR. La combinación de estos marcadores se utiliza para la creación de bases de datos.<sup>45</sup>

### 2.7.2 *CODIS: Sistema de Índice Combinado de ADN (Combined DNA Index System)*

El CODIS o Sistema de Índice Combinado de ADN es un programa, el cual contiene bancos de datos locales de perfiles de ADN de personas con algún proceso jurídico, muestras de ADN localizadas en lugares donde ocurrió algún delito y perfiles de ADN de personas reportadas como desaparecidas. En EE. UU. el FBI se considera un líder en el desarrollo de tecnologías de tipificación de ADN para su uso en la identificación de culpables de delitos violentos. Desde 1997 el FBI anunció la creación del CODIS mediante la selección de trece locus STR, los cuales formarían el núcleo central de esta base de datos nacional.<sup>45</sup>

Los trece principales locus utilizados en esta base de datos son: CSF1PO, FGA, THO1, TPOX, SVA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, S13S317, D16S539, D18S51, D21S11. Una gran limitante que presenta CODIS, es que se construye únicamente de individuos involucrados en procesos legales o que hayan estado implicados en crímenes, así como personas que han sido reportadas como desaparecidas dejando fuera a la demás población de EE. UU.<sup>45, 46</sup>

En México se ha logrado instalar una base de datos en Genética Forense, la cual es un archivo electrónico en el que se almacenan perfiles genéticos obtenidos a través de muestras biológicas de individuos que se encuentran involucrados con una investigación judicial o ministerial. A Octubre de 2010 se tenían registros de 9 758 perfiles genéticos, los cuales han permitido identificar a personas o cadáveres sujetos a investigación penal. Esta Base

Nacional de Genética Forense está integrada por la Procuraduría General de la República (PGR) y 17 Procuradurías Estatales, entre las cuales se encuentra ausente el Estado de Hidalgo.<sup>47</sup>

## **2.8 Diversidad genética**

Se define como variabilidad genética al componente más básico de la biodiversidad y son las variables que se heredan de un individuo a otro dentro de una población. La biodiversidad se deriva también de los procesos evolutivos que operan sobre estas variaciones. Su comprensión es de suma importancia tanto para la conservación, el avance de la genética evolutiva, así como para la salud pública y la biomedicina. Uno de los objetivos de las investigaciones que tratan de determinar el mapa genómico de una población, es el de conocer su riqueza genética de cada población estudiada, así como realizar una evaluación de los riesgos de ciertas enfermedades.<sup>48</sup>

La medicina genómica se ha convertido en una prioridad para el Gobierno Mexicano, desde el año 2000 se le ha considerado como una estrategia para enfrentar enfermedades que aquejan a la población y que resultan tener un gran impacto a nivel económico para la sociedad. Durante el año 2000 se inició una planeación estratégica de la medicina genómica que culminó con la creación del Instituto Nacional de Medicina Genómica en el año 2004. En la actualidad las investigaciones genómicas se enfocan más en el desarrollo y construcción de mapas de haplotipos de la población mexicana, estudios que buscan asociar en genoma completo con enfermedades comunes como la diabetes, obesidad, diferentes tipos de cáncer o enfermedades cardiovasculares, así como investigaciones aplicadas que tratan de descubrir los biomarcadores para varios tipos de cáncer.<sup>49</sup>

### **III. Antecedentes del Problema**

#### **3.1 Enfermedad de Chagas en México**

Diversas investigaciones tratan de determinar las causas aparentes del incremento de casos reportados de enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es considerada un problema de salud pública actual, debido a que el contagio de dicho padecimiento se ha ido expandiendo a lo largo de todo el territorio mexicano afectando principalmente a poblaciones vulnerables o de escasos recursos.<sup>49</sup>

La investigación de la Enfermedad de Chagas en México comienza aproximadamente en 1936 con los trabajos de Mazzotti. Los primeros casos reportados en humanos fueron en 1940 en Tejomulco, Oaxaca.

A través de los años, la infección se ha reportado en diferentes estados como en Yucatán, Sonora, Guerrero, Oaxaca, Nayarit y el Estado de México, principalmente en zonas rurales y con gente de escasos recursos. Sosa-Jurado y colaboradores establecieron en su estudio del año 2006 nuevos casos de tripanosomiasis en los Estados de Puebla y Chiapas, donde encontraron una seroprevalencia de anticuerpos de 22% y 4%, respectivamente, y un 20% de anormalidades electrocardiográficas en los pacientes de ambos estados.<sup>50</sup>

#### **3.2 Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas en México**

Se calcula que existen alrededor de dos millones de personas infectadas con la Enfermedad de Chagas, 650 000 casos en fase crónica y 69 000 nuevos casos reportados al año.<sup>51</sup> Los estados con mayor registro de casos de Enfermedad de Chagas se encuentran colindando con el Pacífico, debido a que es en esa zona del país donde se presenta una mayor abundancia de géneros y especies de triatóminos<sup>52</sup> siendo los estados de Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Oaxaca los más estudiados actualmente.<sup>53</sup>

En México dos tercios del territorio tienen las condiciones adecuadas para que el triatómino sobreviva y se convierta en una importante fuente de transmisión vectorial con 32 especies distintas del insecto.

Las poblaciones vectoriales por su capacidad de convivencia con el humano, se consideran domiciliadas, peridomiciliadas y selváticas o silvestres; en nuestro país las especies intradomiciliadas son *Triatoma barberi*, asociada a la presencia de miocardiopatías y megas (dilataciones) de órganos del tracto digestivo en Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz. *Triatoma dimidiata*, distribuida desde los países andinos y de Centroamérica hasta México, asociada a cardiopatías en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán.

### **3.3 Diversidad Genética en México**

En México existe una enorme diversidad genética, la cual se ha estudiado mediante diversas investigaciones basadas principalmente en la secuenciación del genoma humano. De acuerdo a “El Proyecto del Genoma Humano (1990-2004)”, los seres humanos compartimos aproximadamente el 99.9% de la secuencia genómica; el 0.1% restante es el que otorga la individualidad a cada persona, dándole características propias. Son estas últimas variaciones las responsables de otorgar diferentes grados de vulnerabilidad a enfermedades tales como diabetes, cáncer, hipertensión, etc.<sup>54</sup>

Diversas investigaciones a nivel nacional han analizado alrededor de un millón de variaciones genéticas de más de mil personas pertenecientes a diferentes grupos étnicos del país. Un caso particular donde se ha observado esta enorme variabilidad genética es entre los Seri, grupo que habita principalmente en el Estado de Sonora, y los mayas lacandones, habitantes de la frontera de México con Guatemala. Estas dos etnias al ser analizadas

mostraron una variación tan marcada como si fuesen dos grupos analizados de diferentes países.

Esta variedad genética ha servido para identificar las implicaciones en las enfermedades según el lugar donde se encontraban en el territorio mexicano. Tal es el caso de enfermedades pulmonares, en las cuales se reconoce ampliamente la importancia de la herencia genética. En este estudio se analizaron muestras genéticas de 511 personas, las cuales representaban los 20 grupos indígenas y otras 500 pertenecientes a etnias mixtas o mestizos. Los resultados obtenidos arrojaron una gran diferencia en la capacidad pulmonar entre los mexicanos considerados como mestizos y los de descendencia indígena del oeste y este del país; estas diferencias son clínicamente significativas y podrían tener importantes implicaciones para la diagnosis de enfermedades pulmonares.<sup>55</sup>

“Análisis de la diversidad genómica en las poblaciones mestizas mexicanas para desarrollar medicina genómica en México” fue uno de los estudios realizados en el país, el cual su principal objetivo fue el de determinar variaciones genéticas comunes en la población mestiza para realizar comparaciones en diferentes regiones de México. Este proyecto inició en Junio de 2005 y los resultados de la primera fase se entregaron en Mayo de 2009 a través de la publicación del artículo científico “Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico” también conocido como el “Mapa del Genoma de Poblaciones Mexicanas”, el cual aparece publicado en la revista Proceedings of the National Academy of Science (PNAS).

En este estudio se colectaron 300 muestras sanguíneas de individuos mestizos no emparentados y de 30 amerindios zapotecas. Se obtuvieron muestras anónimas de siete estados de México: Guanajuato, Guerrero, Sonora, Veracruz, Yucatán, Zacatecas y Oaxaca.

Los resultados de este trabajo indicaron que las grandes diferencias genéticas entre mestizos de diferentes regiones de México se deben principalmente a diferencias en contribuciones ancestrales. Este trabajo se considera como una evaluación inicial del

beneficio potencial de generar un mapa de haplotipos de mexicanos para optimizar el diseño y análisis de estudios de asociación genética en esta población.<sup>56</sup>

Diversas investigaciones realizadas en México han utilizado como base todos o alguno de los trece STR's usados en el CODIS. Tal es el caso de "Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense", estudio realizado en el año 2014, el cual tuvo como objetivo general la obtención de una base de datos realizada con una muestra representativa de la población del Estado de Zacatecas, mediante la recopilación de muestras de sus municipios y obtener el perfil genético de cada una de éstas. Se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas para crear la base mencionada con la finalidad de utilizarlas para cálculos estadísticos en casos forenses.

En este estudio se utilizaron los trece locus mencionados en el CODIS, además de que se añadieron tres más (D2S1338, D19S433, y uno extra para Amelogenina) analizando así quince marcadores STR. El tamaño de la muestra se obtuvo mediante la aplicación de la ley de Hardy-Weinberg y realizando los cálculos necesarios considerando el tamaño de la población total del Estado de Zacatecas. En este estudio se obtuvieron las frecuencias alélicas de la población Zacatecana encontrando alelos que no se habían reportado en estudios de población realizados anteriormente, se emplearon estos datos en casos forenses de manera exitosa con resultados más exactos.<sup>38</sup>

Otro caso en donde se utilizaron STR's como marcadores fue "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 centro de México." En este estudio se seleccionaron 300 muestras de ADN de individuos originarios de las seis áreas geográficas que conforman el área metropolitana de la región centro del país: Ciudad de México; Pachuca, Hidalgo; Puebla; Tlaxcala; Cuernavaca, Cuautla; Toluca, Lerma y Querétaro, San Juan del Río. Los marcadores que utilizaron fueron D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S17, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 y FGA. De los trece

marcadores que se describen en el CODIS, once fueron utilizados para este estudio. Como resultado, se obtuvieron siete marcadores que no habían sido descritos para la población de la Ciudad de México.<sup>57</sup>

Los locus más utilizados en los estudios de diversidad genética que se han realizado en la población mexicana mestiza como amerindia han sido APO- B, vWA, TH01, CSF1PO, HPRTB, FGA; siendo vWA y TH01 los que distinguen a la población mexicana respecto a otras poblaciones como las caucásicas o africanas.<sup>58</sup>

En poblaciones urbanas como la Ciudad de México se incluyen los siguientes STR's: D3S1358, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 y D7S820.<sup>59</sup>

Con base en los antecedentes mencionados, para la realización de esta investigación se han tomado como marcadores cinco de los locus más utilizados en estudios previos de diversidad genética en la población mexicana y que se encuentran en el CODIS, los STR's seleccionados son: D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51 y D5S818.

Para la selección de los marcadores antes mencionados se tomó a consideración:

1. Que el locus se encontrara en el CODIS.
2. Que se hubiera utilizado en estudios de diversidad genética aplicados en la población mexicana.
3. Que existieran antecedentes de que el locus seleccionado se haya reportado en poblaciones urbanas, debido a que las muestras que se utilizarán en esta investigación provienen principalmente de zonas urbanas de distintos municipios del Estado de Hidalgo.

Es importante mencionar que el locus TH01 se descarta a pesar de ser uno de los marcadores que distinguen a la población mexicana, debido a que al existir diferencias en las frecuencias alélicas respecto a otras regiones del norte del país, estas discrepancias se encuentran más marcadas en el alelo mencionado, lo mismo ocurre con el STR D3S1358.

Estas diferencias pueden estar relacionadas con el tipo de mestizaje que varía en distintas zonas del país.<sup>56</sup>

### **3.4 Diversidad genética en Hidalgo**

El estado de Hidalgo cuenta con una diversidad genética en su población muy extensa, la cual no se ha identificado por medio de estudios genéticos que determinen sus frecuencias alélicas. La predisposición de muchas de las enfermedades que presenta la población de Hidalgo se puede identificar mediante el conocimiento de los alelos dominantes de sus habitantes.<sup>58, 59</sup>

Tal es el caso de la Enfermedad de Chagas, la cual se puede determinar el riesgo de adquisición mediante la identificación de los alelos dominantes de una muestra de la población infectada con dicha enfermedad. Actualmente no existen estudios previos que tengan como objetivo el conocer o identificar las frecuencias alélicas de sus habitantes por medio del análisis genético de una muestra de su población total.

A nivel estatal no se cuenta con una base de datos donde se contengan los alelos dominantes de su población. La realización de una base de datos genéticos a nivel estatal sirve como inicio para la creación de una base a nivel nacional, la cual pueda contener en ella las frecuencias alélicas de la población mexicana para ser utilizada para la identificación de individuos, así como conocer cuáles son las enfermedades que pueden presentarse en la población, esto con la finalidad de destinar recursos para la investigación de las mismas.<sup>59</sup>

#### IV. Planteamiento del Problema

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública, debido a que los casos reportados han ido en aumento en los últimos años. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en el 2016 se han registrado alrededor de siete millones de personas infectadas a nivel mundial. Para Diciembre de 2017 la cifra de casos reportados de pacientes con enfermedad de Chagas a nivel mundial ha aumentado llegando casi a 8 millones.<sup>15</sup>

Dicha enfermedad se encuentra principalmente en países latinoamericanos como Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Suriname, Uruguay y Venezuela.<sup>16</sup>

México es considerado como país endémico de la enfermedad de Chagas, la cual se distribuye ampliamente siendo las zonas rurales más propensas a que sus pobladores contraigan la enfermedad, aunque no se eximen las zonas urbanas. Actualmente, dos terceras partes del país se consideran en riesgo de transmisión, es decir, 1 100,000 mexicanos podrían estar infectados con *Trypanosoma cruzi* y 29 500,000 se encuentran en riesgo latente de contraer dicha infección.<sup>60</sup>

Del año 2000 a 2012 la Secretaría de Salud registró 5, 559 casos de enfermedad de Chagas en la República Mexicana siendo Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco los estados con mayor incidencia. En el 2013 se registraron alrededor de 762 nuevos casos y 729 en el 2014, se registraron 371 defunciones, la mayoría en los estados de Oaxaca y Guerrero. Hidalgo se ubica entre los primeros cinco estados a nivel nacional que presentan la enfermedad de Chagas. En Hidalgo la chinche transmisora de la enfermedad se distribuye a lo largo de la región, esto contribuye a que existan casos de la enfermedad de Chagas presentes en la región. En el año 2015 los casos reportados fueron 43, lo que representa un incremento en la transmisión de la infección.<sup>61</sup>

De Enero a Junio de 2016 se diagnosticaron 58 casos en Hidalgo siendo Actopan, Huichapan, Huejutla y Pachuca los municipios con mayor incidencia. Municipios como Tula,

Tulancingo y Apan han presentado casos de pacientes infectados aunque en menor incidencia. De acuerdo al Boletín Epidemiológico Nacional, en la semana 39 correspondiente a Octubre de 2017 se registraron 41 casos de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas para el Estado de Hidalgo, <sup>62</sup> lo que indica un incremento notable de casos en comparación con el mes de Julio del mismo año, en el cual se reportaron 29 casos de pacientes diagnosticados con Chagas en etapa crónica.<sup>62</sup>

A nivel nacional Hidalgo ocupa el cuarto lugar en cuanto a casos reportados de pacientes con enfermedad de Chagas en etapa crónica, antecedido por los estados de Veracruz con 93 casos, Oaxaca con 83 y Jalisco con 46 casos.<sup>62</sup>

En México se han realizado diversos estudios con la finalidad de determinar las frecuencias alélicas de alguna población en específico, muchos de estos estudios han tenido como resultados la identificación de los loci más frecuentes de cierta población a estudiar, así como la obtención de una base estadística donde se almacenan todos los datos obtenidos.<sup>62</sup>

Actualmente, no se ha identificado si existe una relación entre la enfermedad de Chagas y las frecuencias alélicas de una población en particular, por lo que es necesario establecer si esta relación existe o no entre ambas variables.

## **V. Justificación**

De acuerdo a los casos de Chagas reportados en el Estado de Hidalgo, la enfermedad se ha extendido a lo largo del territorio hidalguense, convirtiéndose así en un problema de salud pública, lo cual representa la importancia del estudio de los factores que pueden representar un riesgo latente para la población a adquirir la enfermedad de Chagas.

Es de gran importancia estudiar todos y cada uno de los factores que representen un mayor riesgo a adquirir la enfermedad de Chagas, debido a que como las cifras reportadas lo demuestran, la infección ha logrado prevalecer no sólo en las poblaciones más vulnerables del Estado de Hidalgo, sino que también se están presentando nuevos casos de Chagas en zonas urbanas y suburbanas. Este incremento de casos de pacientes con enfermedad de Chagas reportados indica que puede existir además de los factores ambientales que favorecen la proliferación del vector de la enfermedad, factores internos que representan una mayor vulnerabilidad a adquirir dicha infección como pueden ser factores genéticos.

Existen estudios previos que tienen como objetivo determinar cuáles son las causas principales de que una población específica presente una mayor vulnerabilidad a adquirir la enfermedad de Chagas; sin embargo, estas investigaciones se centran principalmente en estudiar la relación entre el medio en el que se desarrolla la población como puede ser la interacción con otros animales, la prevalencia del insecto transmisor de la infección en la zona geográfica estudiada, así como la relación entre las viviendas y el riesgo de contagio que presentan los individuos. Es necesario realizar estudios genéticos para determinar si existe una relación entre la adquisición de la enfermedad de Chagas y las frecuencias alélicas de los individuos de una misma población, ya que no existen estudios previos que comprueben o descarten esta relación entre ambas variables.

Debido a que México es considerado como país endémico de la enfermedad de Chagas, los casos de pacientes diagnosticados con Chagas van en un considerable aumento, siendo el Estado de Hidalgo el cuarto lugar en cuanto a casos reportados de pacientes con enfermedad de Chagas en etapa crónica, antecedido únicamente por Veracruz, Oaxaca y Jalisco.

La predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas no ha sido estudiada anteriormente, lo que representa una faltante de información para reconocer todos los riesgos latentes que corre la población hidalguense a contraer dicha enfermedad.

## **VI. Hipótesis**

La identificación de las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51 y D5S818 en la población de Hidalgo que presenten la enfermedad de Chagas, ayudará a valorar la predisposición genética de adquirir dicha enfermedad.

## **VII. Objetivos**

### *7.1 Objetivo General*

Analizar la asociación de la enfermedad de Chagas a las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos D7S820, D8S1179, D21S11, D18S51 y D5S818 en habitantes del Estado de Hidalgo.

### *7.2 Objetivos particulares*

- Generar una colección de muestras de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas y de individuos sanos nacidos en Hidalgo.
- Obtener el material genético de cada una de las muestras.
- Realizar la secuenciación del material genético obtenido de la extracción de ADN de las muestras sanguíneas.
- Calcular las frecuencias alélicas.

## VIII. Material y Métodos

### 8.1 Contexto de la investigación

Las muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas se obtuvieron en el Área de Epidemiología de la Clínica 32 del IMSS en Pachuca Hidalgo. Para la obtención de la muestra se contó con el material pertinente como son agujas, torundas de algodón con alcohol y tubos vacutainer con anticoagulante, se utilizó material nuevo debidamente esterilizado y desechable. Una vez que se resguardó la muestra sanguínea, se etiquetó y se transportó al laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAEH ICSa.

Para su transportación correcta se contó con gradillas especiales para evitar así el movimiento excesivo que pueda ocasionar la hemólisis, coagulación o contaminación bacteriana de la muestra además de ser transportadas en hieleras para evitar la exposición a cambios de temperatura que pudiera alterar la composición de las muestras sanguíneas. Una vez en el laboratorio de microscopía, se homogeneizó correctamente cada una de las muestras para deshacer algún coágulo que haya podido formarse durante el tiempo entre la obtención y el transporte de la muestra evitando movimientos bruscos en todo momento.

Las muestras sanguíneas se comenzaron a procesar inmediatamente en el laboratorio de microscopía. Se usaron alícuotas para evitar el desperdicio del material biológico. La recolección de muestras comenzó el día 15 de Enero de 2017 y culminó aproximadamente a los 120 días de haber comenzado.

El tamaño de la muestra fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{k^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{e^2 \cdot (N-1) + k^2 \cdot p \cdot q}$$

Donde:

N= tamaño de la población total

k= constante que depende del nivel de confianza

e= error muestral

p= proporción de individuos que poseen la misma condición a estudiar

q= proporción de individuos que no poseen la condición que se estudiará.

n= tamaño de la muestra

Las 44 muestras sanguíneas requeridas para formar parte del grupo control se obtuvieron de individuos sanos que pertenecieran al Estado de Hidalgo y no presentaran ningún parentesco entre sí. Su recolección, transporte y manejo dentro del laboratorio fue el mismo descrito para las muestras sanguíneas de pacientes con enfermedad de Chagas. Estas muestras se obtuvieron a partir del día 15 de Enero de 2017 terminando su recolección el 15 de Marzo de 2017.

Para la amplificación, secuenciación y tipificación de ADN se contó con el apoyo del Posgrado en Ciencias Genómicas (PCG) de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) para llevarse a cabo. Este punto contó con la dirección del Dr. José de Jesús Olivares Trejo, quien funge como Profesor Investigador de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y cuyas líneas de Investigación al momento se desarrollan en Agentes Infecciosos de Importancia en Humanos y Genómica Humana. Esta etapa de la investigación tuvo una duración aproximada de cuatro meses.

Dicho análisis estadístico comenzó el día 20 de Octubre de 2017 y terminó aproximadamente el 20 de Febrero de 2018, concluyendo así la metodología del estudio.

## *8.2 Tipo de estudio*

El tipo de estudio que se realizó es un estudio transversal, ya que las variables se midieron una sola vez; analítico debido a que se evaluaron si existe una relación entre las frecuencias alélicas de la población del Estado de Hidalgo y observacional puesto que se observaron la existencia de los marcadores genéticos en las muestras genéticas de pacientes infectados con enfermedad de Chagas. Se evaluó si existen frecuencias alélicas que predispongan a la población de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas.

### 8.3 Definición de variables

**Tabla 1.** Definición de variables

<b>Variable</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Definición para el estudio</b>	<b>Medición</b>
Edad	Cuantitativa discreta	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo.	Años cumplidos de cada participante del estudio.
Sexo	Cualitativa dicotómica	Variable biológica y genética que divide a los seres humanos en dos posibilidades únicas: hombre o mujer.	Sexo de cada participante: hombre o mujer.
Municipio	Cuantitativa	División territorial política- administrativa de una entidad federativa.	Identificar y anotar a qué municipio pertenece cada participante del estudio.
Enfermedad de Chagas	Cualitativa nominal	Enfermedad causada por la transmisión del protozooario <i>Trypanosoma cruzi</i> debido a la picadura del triatómino o chinche besucona.	Presenta, presentó o no presenta la Enfermedad de Chagas.
Frecuencias alélicas	Cualitativa nominal	Proporción de cada alelo en un locus específico.	Identificación de frecuencias alélicas mediante el uso de marcadores genéticos.

## *8.4 Criterios de inclusión y exclusión*

### *8.4.1 Criterios de inclusión*

Las muestras debían pertenecer a pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas en cualquiera de sus fases de la infección, aguda o crónica; y que hayan sido recién diagnosticados o hayan presentado la infección anteriormente. Las muestras para el grupo control se obtuvieron de individuos sanos que hayan nacido en cualquiera de los 84 municipios de Hidalgo y que no presentaran enfermedades genéticas. Se incluyeron además únicamente a las personas que hayan firmado el consentimiento informado.

### *8.4.2 Criterios de exclusión*

Los individuos con enfermedad de Chagas deben tener un diagnóstico médico, no se incluyeron a personas que presentaran sintomatología, pero no contarán con una revisión médica y estudios de laboratorio para corroborar su condición.

Para la muestra control los individuos debieron ser sanos y no presentar ningún padecimiento o enfermedad genética, esto se determinó mediante la aplicación de un cuestionario. No se debe existir ningún parentesco entre los participantes.

Se descartaron los pacientes que de manera voluntaria hayan decidido abandonar el estudio y a pacientes que durante el estudio fueran diagnosticados con algún padecimiento o enfermedad genética.

## **8.5 Métodos**

### *8.5.1 Selección de pacientes*

Para el grupo problema, los participantes seleccionados para este estudio fueron pacientes de cualquiera de los municipios del Estado de Hidalgo diagnosticados con enfermedad de Chagas en cualquiera de sus fases, aguda o crónica. Cada uno de los participantes debió contar con pruebas de laboratorio que confirmara la presencia de la enfermedad, de esta manera, se descartaron los pacientes que presentaran la sintomatología, pero que no presentaran un diagnóstico médico que corroborara su condición clínica. Para la obtención de resultados no se consideraron a los participantes que por alguna razón decidieron abandonar el estudio.

Para el grupo control, se seleccionaron individuos sanos que hayan nacido en el Estado de Hidalgo y que no reportaran enfermedades genéticas, además de que ninguno de los participantes presentara parentesco entre ellos. En caso de que alguno de los participantes fuera diagnosticado con alguna enfermedad genética durante el desarrollo del estudio, su muestra no fue considerada en los resultados finales.

### *8.5.2 Firma de consentimiento informado*

De acuerdo al Artículo 14 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, toda investigación que requiera la participación directa o indirecta de humanos o muestras obtenidas de los mismos, debe contar con un consentimiento informado, el cual deberá darse a conocer a la totalidad de sus participantes antes de iniciar con el estudio, cerciorándose siempre de su entendimiento por parte de los participantes.

El estudio deberá ser realizado por profesionales de la salud a que se refiere el Artículo 114 de este reglamento (Se consideran profesionales de la salud aquellas personas cuyas actividades relacionadas con la medicina, odontología, veterinaria, biología, bacteriología,

enfermería, trabajo social, química, psicología, ingeniería sanitaria, nutrición, dietología, patología y sus ramas y las demás que establezcan otras disposiciones legales aplicables, requieren de título profesional o certificado de especialización legalmente expedido y registrado por las autoridades competentes), con conocimientos y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud que actúe bajo la supervisión de las autoridades sanitarias competentes y que cuente con los recursos humanos y materiales necesarios, que garanticen el bienestar del sujeto de investigación.

Una vez seleccionados los participantes para el estudio, se les proporcionó el consentimiento informado. Se procedió a leerlo junto con el participante para su comprensión y aclarar todas las dudas que surgieran durante su interpretación. Después de que se leyó y comprendió el consentimiento informado, se invitó al participante a firmar dicho documento para proceder con la toma de muestra.

### *8.5.3 Obtención de muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas e individuos sanos.*

El siguiente paso fue obtener las muestras sanguíneas de cada uno de los participantes del estudio. Para cada muestra se obtuvieron 2 ml de sangre por punción intravenosa. Las muestras se obtuvieron con este tipo de punción, debido a que se buscó que la sangre tuviera una composición uniforme para que la extracción y purificación de ADN se pudiera realizar de una forma más eficaz. A diferencia de la sangre que se obtiene por punción capilar o de la piel es una mezcla de sangre procedente de arteriolas, vénulas y vasos capilares, por lo tanto un porcentaje de esta sangre es de origen arterial y otro porcentaje de origen venosa.

La punción venosa se realizó utilizando jeringas de plástico nuevas y esterilizadas para cada participante. Se le pidió al paciente se colocara en una posición cómoda donde se sintiera seguro para realizar la punción, se le mostró en todo momento que el material utilizado estaba debidamente sellado. Posteriormente, se le aplicó un torniquete en el brazo

izquierdo para así facilitar la toma de la muestra debido a que las venas del brazo se exponen de mejor manera garantizando así obtener la muestra con una sola punción. Una vez que se obtuvo la muestra, el material sanguíneo se depositó en tubos vacutainer estériles con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con una concentración de 0.5 ml de solución al 1% para 5 ml de sangre para evitar su coagulación. En estudios previos las muestras sanguíneas recogidas con EDTA mostraron una notable estabilidad en sus elementos celulares, sin evidencias de hemodiálisis hasta por ocho días de conservación. Se utilizaron 800  $\mu$ l de cada muestra con alícuotas de 100  $\mu$ l, las cuales tienen de 3.5 a 9.8 x 10<sup>3</sup> leucocitos/ $\mu$ l en ocho tubos de 1.5 ml.

#### *8.5.3.1 Transporte de muestras sanguíneas*

Una vez obtenidas las muestras, se etiquetó cada tubo para identificar cada muestra depositada en los mismos. Se trasladaron al laboratorio en hieleras de plástico con hielos para mantener una temperatura adecuada. Durante su traslado se evitaron movimientos bruscos o agitarlos, ya que la sangre puede hemolizarse. Se entiende por hemólisis a la rotura de las células rojas o eritrocitos, lo cual libera hemoglobina junto con otras moléculas alterando las concentraciones de los componentes sanguíneos.

#### *8.5.3.2 Almacenamiento de muestras sanguíneas*

Las muestras se conservaron en refrigeración a 4 °C durante un periodo máximo de 24 horas hasta el momento de su procesamiento para evitar así el envejecimiento celular y la hemólisis. Antes de comenzar con el procesamiento de cada muestra, se homogenizó el material sanguíneo con movimientos oscilatorios suaves para deshacer algún coágulo que se hubiera formado debido al almacenamiento de la muestra y para impregnar la sangre con el anticoagulante.

#### *8.5.4 Extracción y purificación de ADN*

Una vez que se obtuvieron las muestras sanguíneas con EDTA de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas y de individuos sanos, se refrigeraron durante 25 min.

Se tomaron tres alícuotas de 100 µl de las muestras previamente refrigeradas. Se agregaron 600 µl de solución de lisis de eritrocitos, el cual contiene Tris Hydrocloridiae 10 mM pH 8, Tritón X- 100 al 1% y sacarosa al 11%.

La eliminación de los restos de eritrocitos (lavados) se realizó 3 veces. Para ello, se centrifugaron las alícuotas a 12 000 rpm, a 4 °C durante 3 min. descartando el sobrenadante.

Posteriormente, se agregó solución de lisis de leucocitos, el cual contiene Tris- HCl 10 mM pH 8, NaCl 400 mM y EDTA 2 mM y solución de proteínasa K 1 mg/ml; SDS 1% y EDTA 2 mM. Se incubó a 65 °C durante una hora con agitación vortex cada 10 min.

Posterior a la incubación, se procedió a eliminar las proteínas de la muestra, esto se realizó mediante la precipitación salina agregando 200 µl de acetato de potasio 3 M y se centrifugó a 12 000 rpm, 4 °C durante 5 min.

Una vez que se obtuvo el sobrenadante, se centrifugó a 12 000 rpm, 4 °C durante 5 minutos y se repitió este punto.

La precipitación del ADN se realizó obteniendo el sobrenadante del paso anterior, a éste, se agregó un volumen de etanol absoluto frío y de refrigeró a -20 °C durante 25 min.

Después de la refrigeración, la muestra se centrifugó a 12 000 rpm, 4 °C por 5 min.

Una vez obtenida la pastilla, se lavó con etanol al 70% y se congeló por 20 min.

Después del tiempo transcurrido, se realizó una centrifugación más a 12 000 rpm, 4 °C por 5 min. y se decantó el etanol, la muestra se mantuvo por 24 horas a -20 °C.

Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12 000 rpm, 4 °C por 5 min. y se extrajo el etanol sobrante.

Se realizó un último lavado con etanol al 70%.

Finalmente el ADN genómico fue resuspendido con 50 µl de agua desionizada.

#### *8.5.4.1 Integridad del ADN*

Para corroborar que se obtuvo el ADN genómico se realizó electroforesis en gel. La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN u otras macromoléculas como proteínas. Esta técnica consiste en aplicar una corriente eléctrica a través de una matriz de gel por donde pasan las moléculas que se analizarán. De acuerdo al tamaño y la carga de las moléculas, éstas se desplazarán por la placa de gel en diferentes direcciones y velocidades separándose unas de las otras. Las moléculas con menor tamaño viajarán a mayor distancia a través de la matriz de gel, mientras que las moléculas de mayor tamaño y con mayor densidad se desplazarán a una corta distancia en el gel. Para obtener la placa de gel se debe calentar agarosa o poliacrilamida en una solución amortiguadora (agua con algunas sales) y se deja gelificar. El gel contiene unas pequeñas ranuras denominadas pozos que son donde se colocarán las muestras de ADN.

Antes de agregar las muestras de ADN, el gel debe colocarse en una cámara. Uno de los extremos de la cámara se conecta a un electrodo positivo y el otro extremo se conecta a un electrodo negativo. El cuerpo principal de la cámara donde se coloca el gel se llena con solución amortiguadora con sales que puede conducir la corriente.<sup>73</sup>

A continuación, se aplica energía eléctrica a la cámara y empieza a fluir corriente a través del gel. Los grupos fosfato de su esqueleto de azúcares-fosfato le otorgan una carga negativa a las moléculas de ADN, por lo que comienzan a moverse a través de la matriz de gel hacia el polo positivo.<sup>73</sup>

En este estudio, la integridad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis a 100 volts en un gel de agarosa al 1 %. Los geles teñidos con bromuro de etidio. Para ello se realizó la electroforesis en gel de agarosa, un polisacárido, el cual es más utilizado para correr muestras de ADN debido al tamaño de sus moléculas. Se utilizó como solución amortiguadora Tris Ácido acético EDTA (TAE). Esta solución es más recomendable para el análisis de fragmentos grandes de ADN, ya que corren más rápido y tienen mayor capacidad de discriminación en un gel de agarosa a 0.8 %. Los geles utilizados en este trabajo fueron geles al 1 %.

Después de que se obtuvo la placa de gel de agarosa, se colocó en cada pozo una muestra del ADN genómico extraído de las muestras de cada paciente. Se colocó el gel en una cámara utilizando TAE como solución amortiguadora. Como marcador de tamaño de pares de bases, se utilizó el ADN del bacteriófago lambda de Gibco-BRL digerido con *Pst I*, lo cual da un marcador tipo escalera. Ya cargados los pozos con las muestras, éstas fueron resueltas a 100 volts durante 40 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.3 ug/ ml y fueron revelados en un transiluminador de luz ultravioleta. Además se observaron y analizaron en un equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa Molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

#### *8.5.5 Cuantificación de ADN*

El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. La concentración de impurezas se cuantificó a una longitud de onda 280 nm para proteínas. Como criterio de pureza se consideró el cociente DO260/ DO280 mayor o igual a 1.6 y menor de 2.0. La concentración de ADN en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  se obtuvo multiplicando el valor de DO260 por 0.05 y por dilución empleada (1:2000).

#### *8.5.6 Sistema de amplificación*

El sistema PowerPlex®21 se utiliza para la identificación humana. Este sistema permite amplificar y detectar cuatro marcadores fluorescentes de 21 loci (20 loci STR y la amelogenina) incluidos: D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, Amelogenina, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX y vWA.

**Tabla 2.** Localización cromosómica y secuencia repetida de locus. Resaltados en negritas los locus analizados en este estudio.

Locus	Localización cromosómica	Secuencia repetida
D3S1358	3p21.31(45.557MB)	TCTA
D1S1656	1q42(228.972Mb)	TAGA
D6S1043	6q15(92.449Mb)	AGAT
D13S317	13q31.1(81.62Mb)	TATC
Penta E	15q26.2(95.175Mb)	AAAGA
D16S539	16q24.1(84.94Mb)	GATA
<b>D18S51</b>	<b>18q21.33(59.1Mb)</b>	<b>AGAA</b>
D2S1338	2q35(218.705Mb)	TGCC/TTCC
CSF1PO	5q33.1(149.436Mb)	AGAT
Penta D	21q22.3(43.88Mb)	AAAGA
TH01	11p15.5(2.149Mb)	AATG
vWA	12p12(5.963Mb)	TCTA
<b>D21S11</b>	<b>21q21.1(19.476Mb)</b>	<b>TCTA</b>
<b>D7S820</b>	<b>7q21.11(83.433Mb)</b>	<b>GATA</b>
<b>D5S818</b>	<b>5q23.2(123.139Mb)</b>	<b>AGAT</b>
TPOX	2p25.3(1.472Mb)	AATG
<b>D8S1179</b>	<b>8q24.13(125.976Mb)</b>	<b>TCTA</b>
D12S391	12q(12.431Mb)	AGAT/AGAC
D19S433	19q12(35.109Mb)	AAGG
FGA	4q28(155.866Mb)	TTTC

#### 8.5.6.1 Amplificación y secuenciación de ADN

El ADN de cada muestra se utilizó como molde para la amplificación del material genético. La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos.

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para obtener copias de una región particular de ADN que sea de interés para su estudio. Al igual que la replicación de ADN, la PCR requiere de una enzima para producir nuevas cadenas de ADN mediante el uso de una cadena existente como molde. La ADN polimerasa que se utiliza para la replicación en la PCR es la Taq polimerasa, la cual se aisló y se obtuvo de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta polimerasa es muy termoestable presentando una mayor actividad en temperaturas que oscilan entre los 70 °C, temperatura a la que la ADN polimerasa funciona en condiciones normales.

La taq polimerasa sólo puede comenzar a replicar los fragmentos de ADN de la cadena molde si hay un primer o cebador, el cual es una secuencia de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de la nueva cadena de ADN. Estos cebadores se unen a la cadena molde por complementariedad de bases.

Para la amplificación por PCR primeramente se realizó la optimación de los parámetros de PCR como son: concentración de DNA, temperaturas y tiempos óptimos, concentración de MgCl<sub>2</sub>, concentración de iniciadores, etc.

Para establecer las condiciones de amplificación se realizaron diferentes experimentos manteniendo constantes las concentraciones de buffer de la enzima, dNTP's, DNA polimerasa Taq y oligonucleótidos, así como las temperaturas y tiempos de la amplificación y variando concentración de DNA y/o MgCl<sub>2</sub>.

Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, de un mínimo de 1.0 mM hasta un máximo de 2.5 mM, utilizando 1 ng de ADN y condiciones estándares de amplificación.

Posteriormente, se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de ADN desde 0.2 ng hasta 100 por reacción en condiciones estándares de amplificación y con 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

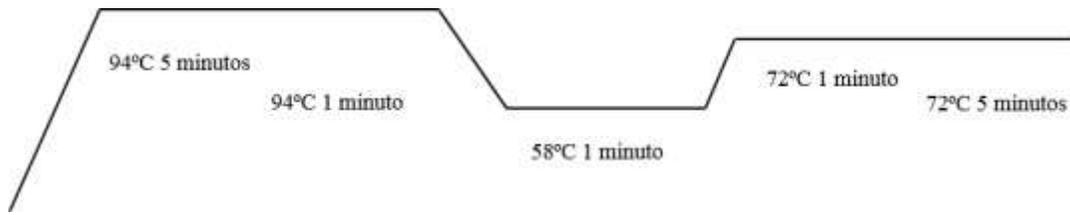
Las muestras se amplificaron con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente y se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Estandarización para la amplificación de ADN.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>
<b>Buffer ADN pol Taq 10X</b>	1X
<b>Primer sentido 10 uM</b>	1 μM
<b>Primer antisentido uM</b>	1 μM
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	1.5 μM
<b>dNTP's 10 mM</b>	0.2 μM
<b>ADN pol Taq 5 U/ul</b>	1 U/μl
<b>ADN 50 ng/ul</b>	10 ng/μl

Esta reacción se homogeneizó suavemente por agitación y posteriormente se colocó en un termociclador.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



**Figura 12.** Condiciones óptimas para la amplificación de ADN.

Para la verificación de la amplificación en gel de agarosa, las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2 % en TAE con un corrimiento a 100 volts durante 45 min. Se tiñó con bromuro de etidio al 0.3 ug/ ml y se observó en un equipo de fotodocumentación.

## 8.6 Análisis Estadístico

El análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas permite verificar el grado de polimorfismo de los microsatélites, caracterizando la variabilidad genética de las poblaciones. Asimismo, la distribución de las frecuencias alélicas y los polimorfismos de ADN poseen características específicas en diferentes poblaciones. En genética forense es indispensable conocer esas diferencias, pues los datos de las frecuencias de perfiles genéticos son los que sustentan los cálculos de probabilidades en los estudios de vínculo genético y en las pericias forenses.

En este sentido, existe la necesidad de estudiar estas frecuencias para que los cálculos estadísticos del análisis de las muestras de un individuo perteneciente a determinada población, sean utilizados permitiendo un mayor índice de confiabilidad de los resultados.

De este modo, para determinar las frecuencias alélicas fueron analizados los siguientes parámetros estadísticos forenses: el poder de discriminación (PD), el contenido de información polimórfica (PIC), la heterocigosidad observada (Hobs) y esperada (Hesp), y el

equilibrio de Hardy-Weinberg (P-value). Todos estos parámetros nos ayudan a determinar la productividad de dichos marcadores en la resolución de casos forenses.

#### *8.6.1 Cálculo de frecuencias alélicas*

La frecuencia alélica es la medida de la proporción relativa de alelos de una población específica. Estas frecuencias se expresan en tantos por ciento o en tantos por uno, y se calculan mediante el recuento de cada alelo y dividiendo este número por el número total de alelos analizados. De esta manera, la suma de las frecuencias alélicas de una población es siempre 1 (o 100 %). Para determinar las frecuencias alélicas los datos genotípicos de cada individuo fueron insertados en el programa informático Power Stats V12.Xls® (Promega Corporation®, Madison, WI. USA).

#### *8.6.2 Poder de discriminación (PD)*

El poder de discriminación se caracteriza por la probabilidad de que dos individuos no relacionados y seleccionados al azar puedan diferenciarse genéticamente mediante el análisis de un marcador o un conjunto de marcadores. El PD depende del número de locus analizados y del polimorfismo de cada uno. En el presente trabajo el poder de discriminación fue calculado utilizando el programa Power Stats V12.Xls® (Promega Corporation®, Madison, WI. USA).

#### *8.6.3 Contenido de Información Polimórfica (PIC)*

El valor del contenido de información polimórfica es un índice que evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo con las frecuencias de los alelos.

Según la clasificación de Botstein, marcadores con valores de PIC superiores a 0,5 son considerados muy informativos, con valores entre 0,25 y 0,50 medianamente informativos y con valores inferiores a 0,25 poco informativos. Para Foissac et al. un microsatélite es considerado como un buen marcador molecular cuando presenta un número de alelos superior a 5 y el PIC con índices por encima de 0,75. En el presente trabajo el contenido de información polimórfica fue calculado utilizando el programa Power Stats V12.Xls® (Promega Corporation®, Madison, WI. USA).<sup>79</sup>

#### *8.6.4 Heterocigosidad*

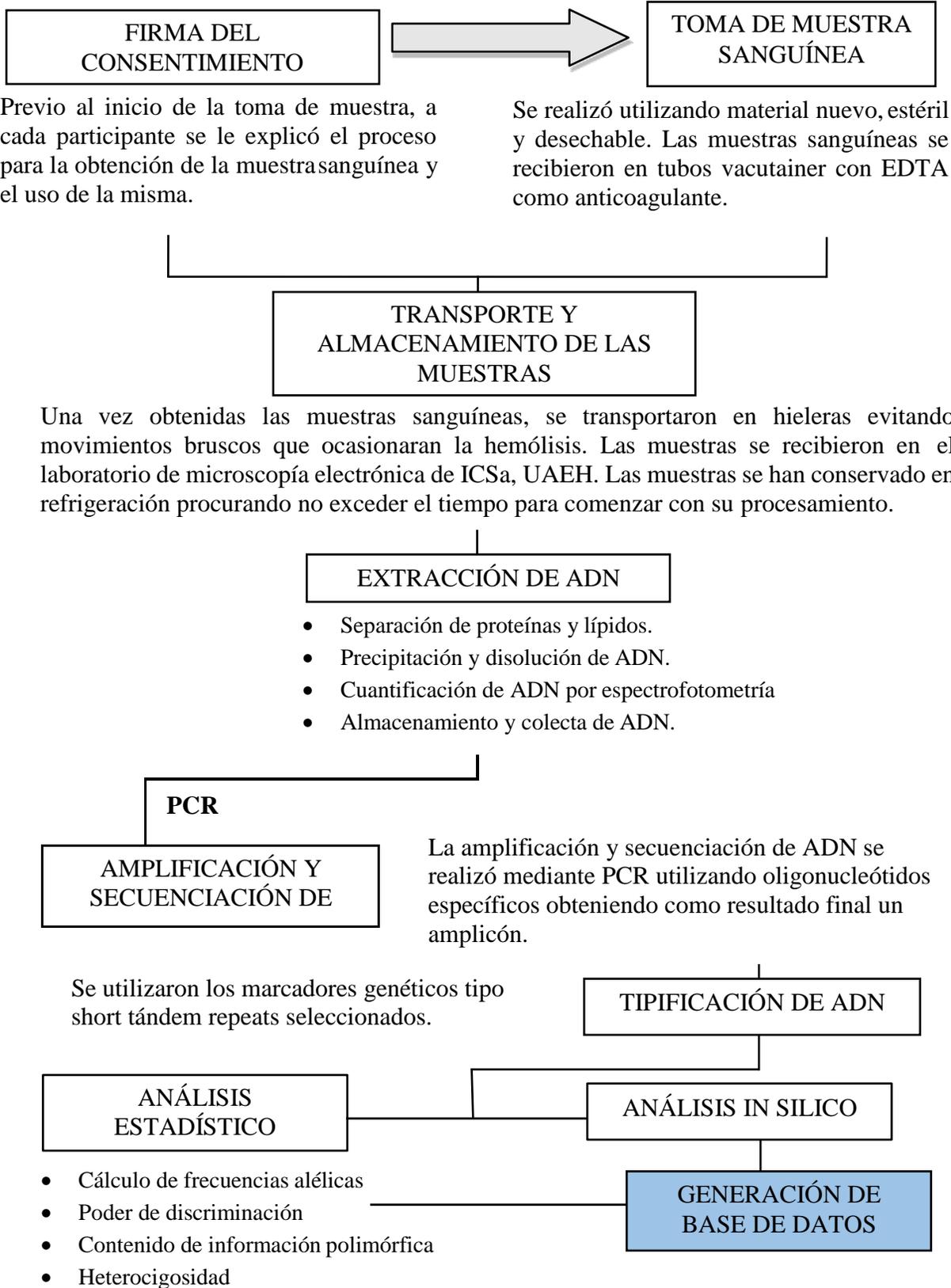
La heterocigosidad observada (Hobs) refleja la frecuencia de individuos heterocigotos encontrados en la población de estudio, mientras que la heterocigosidad esperada (Hesp), es una estimación más precisa de la heterocigosidad en la población. La heterocigosidad es la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomado al azar de la población sean diferentes. Además, la Hesp también es conocida como diversidad génica. En este estudio la heterocigosidad observada fue calculada utilizando el programa Power Stats V12.Xls® (Promega Corporation®, Madison, WI. USA), mientras que para la heterocigosidad esperada fue calculada con el programa Arlequin®<sup>55</sup>.

#### *8.6.5 Equilibrio de Hardy-Weinberg*

La Ley de Hardy-Weinberg fue postulada en 1908 por George Hardy y Wilhelm Weinberg. Según ella “en toda población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no está sujeta a ninguna fuerza evolutiva como mutación, selección y migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación en generación”. De esta manera, una población que cumpla dichas características se dice que está en equilibrio de Hardy-Weinberg. En este contexto, las frecuencias génicas y genotípicas de una determinada población permanecen constantes, generación tras generación, en una población grande y con apareamiento al azar.

Asimismo, el equilibrio de Hardy-Weinberg predice que la frecuencia de los alelos en una población permanecerían iguales (en equilibrio) a través de las generaciones, siempre y cuando se cumpla con las siguientes condiciones: que la población tenga un tamaño bastante grande (población infinita), que el apareamiento ocurra al azar, no ocurre selección natural ni deriva genética y no hay mutaciones.

De este modo, cuando los loci no están en equilibrio de Hardy-Weinberg en algunas poblaciones, podría deberse al hecho de una selección sobre la población en cuestión o bien a la existencia de alelos nulos. Son denominados alelos nulos cuando no pueden ser amplificados por la PCR, es decir, uno de los dos alelos no amplifica y por lo tanto, el individuo es catalogado como homocigoto para el otro alelo. En cambio, si la población estudiada está en equilibrio de Hardy-Weinberg, esta población se quedaría genéticamente inalterada, es decir, presentaría una inercia evolutiva. Sin embargo, las poblaciones están sujetas a factores evolutivos y presentan cantidades variables de loci polimórficos, que caracterizan la variabilidad individual o poblacional de la especie 155. En el presente trabajo el equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado utilizando el programa Arlequin®55.



**Figura 13.** Diagrama de diseño experimental

## IX. Resultados

### 9.1 Tamaño de la muestra y muestreo

El grupo problema estudiado fue conformado por pacientes del Estado de Hidalgo, diagnosticados con la enfermedad de Chagas durante los años 2016 y 2017. Los pacientes que decidieron participar en el estudio firmaron un consentimiento informado y se les explicó el proceso de la investigación.

Los participantes que donaron la muestra sanguínea para este trabajo tuvieron un promedio de edad de 38.8 años al momento de la toma de la muestra. 62.22% fueron hombres y 37.78% mujeres.

El total de muestras obtenidas para este estudio fue de 88, 44 para el grupo control y 44 para el grupo problema. El tamaño de la muestra fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{k^2 * p * q * N}{e^2 * (N - 1) + k^2 * p * q}$$

Donde:

N= tamaño de la población total

k= constante que depende del nivel de confianza

e= error muestral

p= proporción de individuos que poseen la misma condición a estudiar

q= proporción de individuos que no posee la condición que se estudiará.

n= tamaño de la muestra

Para calcular el tamaño de la muestra en este estudio se tomó como constante el valor proporcional a un nivel de confianza de 95.5%, que en este caso es 2. Se consideró un error

muestral de 15%. De acuerdo a la última encuesta intercensal realizada en el 2015 por el INEGI en Hidalgo, el estado cuenta con 2 858 359 habitantes.

$N= 2\ 858\ 359$

$K= 2$ , nivel de confianza: 95.5%

$e= 15\%$

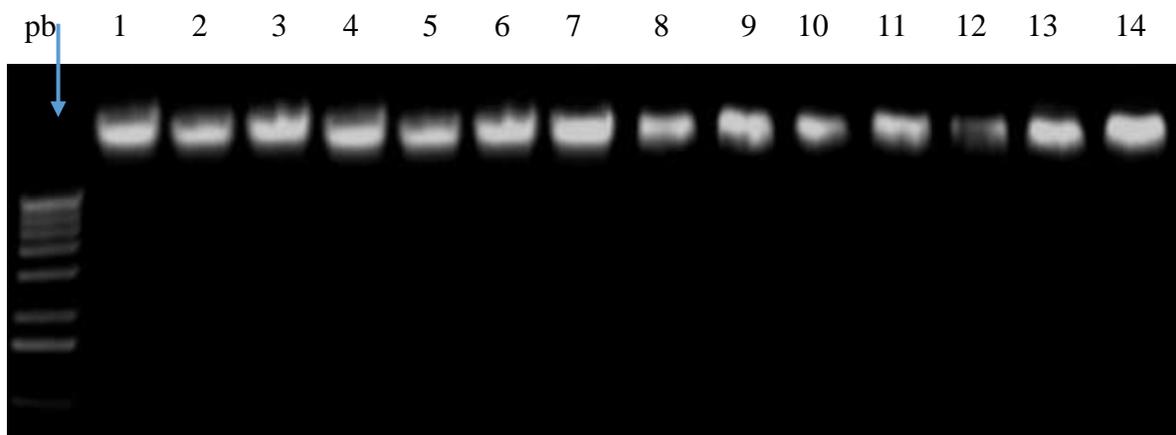
$p= 0.5$

$q= 0.5$

$n= 44$  tamaño de la muestra

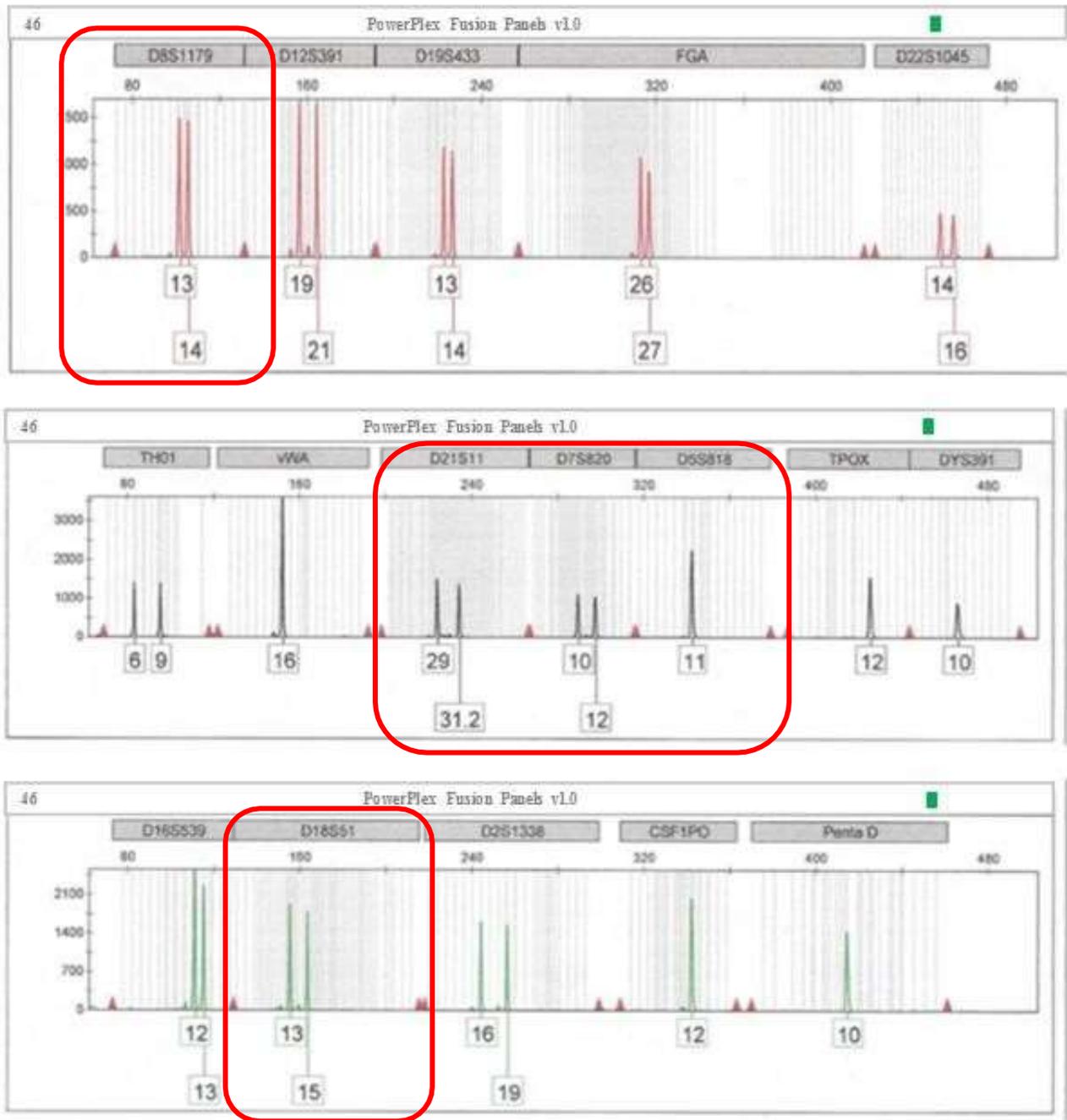
## 9.2 Integridad de ADN

Una vez que las muestras fueron colectadas, se realizó la extracción del ADN. El ADN fue cuantificado y resuelto en geles de agarosa al 1% para observar la integridad. En la Figura 14 se puede observar el ADN extraído de diferentes muestras.



**Figura 14.** Integridad de algunas de las muestras de ADN de individuos con enfermedad de Chagas del Estado de Hidalgo. Se utilizó como marcador de tamaño de pares de bases (pb) el ADN del bacteriófago lamda de Gibco-BRL digerido con *Pst I*.

Posteriormente, se realizó la PCR y la electroforesis capilar para obtener los electroferogramas de las muestras.



**Figura 15.** Electroferograma de la muestra 46 analizada con el panel PowerPlex 21 de Promega. Ejemplo representativo para las 88 muestras analizadas. Los alelos analizados en este trabajo se destacan en color rojo.

Una vez obtenido el perfil genético de cada individuo mediante el software GeneMapper, se determinaron las frecuencias alélicas del grupo control y del grupo problema.

### **9.3 Locus D18S51**

El marcador D18S51 está localizado en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21.33), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (AGAA)<sub>n</sub> 37. Este marcador genético es utilizado en pruebas de paternidad, ya que se ha comprobado que tanto el marcador como las mutaciones de los microsatélites en el locus D18S51 se heredan de generación en generación.

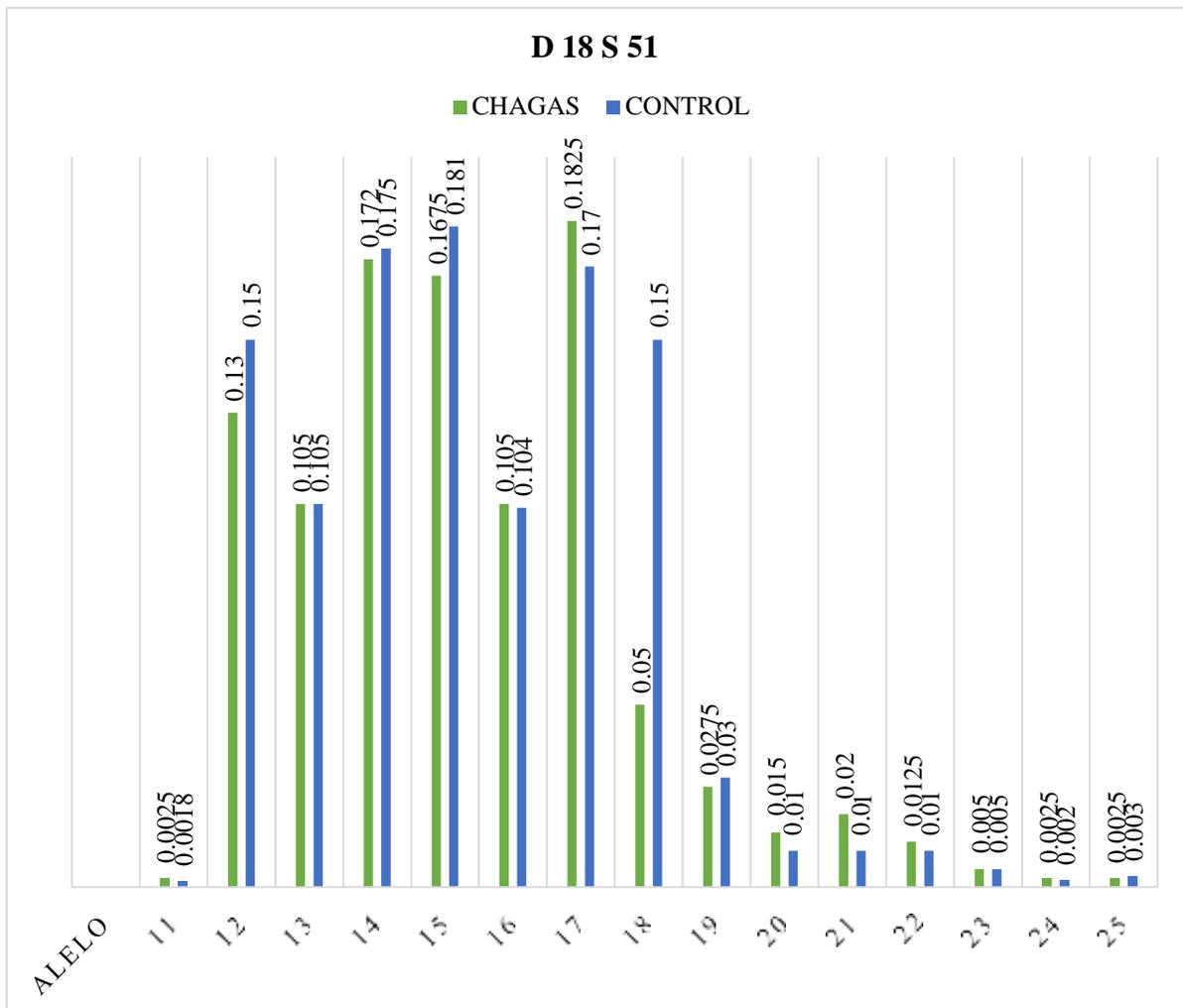
Para el marcador D18S51 se encontró que en el grupo problema los alelos de mayor frecuencia son el 17 y 14, contrario a los alelos 11, 24 y 25 que son los de menor frecuencia.

En el grupo control los alelos más frecuentes fueron el 14, 15 y 17 y los menos frecuentes el 11, el 24 y el 25. Si se comparan los resultados obtenidos entre ambos grupos, se puede observar que el alelo 15 tiene mayor frecuencia únicamente en el grupo control.

Los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas comparadas para el locus D18S51 se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 16.

**Tabla 4.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D18S51 del grupo conformado por individuos sanos (control) y el grupo de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas (problema).

<b>D18S51</b>		
	<b>PROBLEMA</b>	<b>CONTROL</b>
<b>ALELO</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>
<b>11</b>	0.0025	0.0018
<b>12</b>	0.13	0.15
<b>13</b>	0.105	0.105
<b>14</b>	0.172	0.175
<b>15</b>	0.1675	0.181
<b>16</b>	0.105	0.104
<b>17</b>	0.1825	0.17
<b>18</b>	0.05	0.15
<b>19</b>	0.0275	0.03
<b>20</b>	0.015	0.01
<b>21</b>	0.02	0.01
<b>22</b>	0.0125	0.01
<b>23</b>	0.005	0.005
<b>24</b>	0.0025	0.002
<b>25</b>	0.0025	0.003



**Figura 16.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D18S51 en el grupo control y el de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas.

#### **9.4 Locus D21S11**

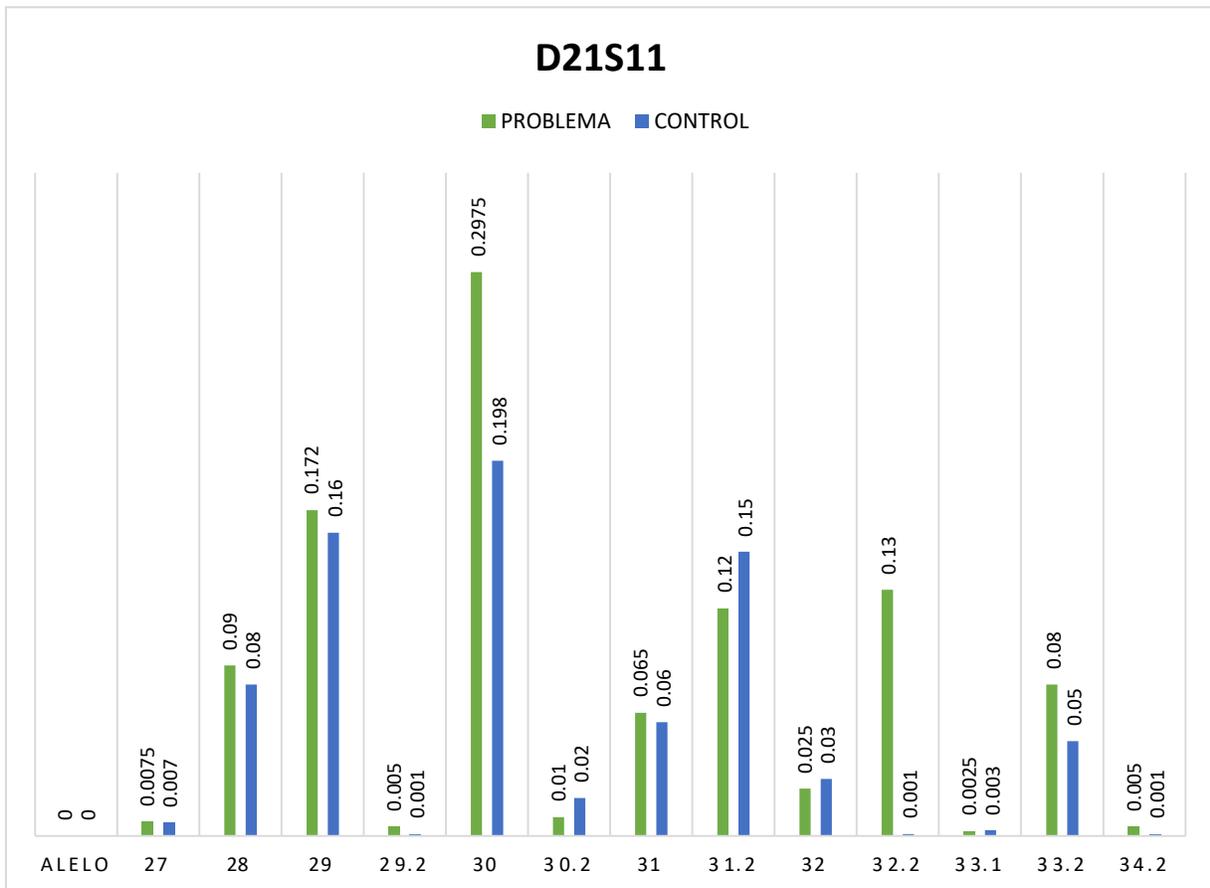
El marcador D21S11 está localizado en el brazo largo del cromosoma 21 (21q21.1), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (TCTA)<sub>n</sub> y (TCTG)<sub>n</sub> 37.

Para el marcador D21S11 se encontró que en el grupo problema el alelo de mayor frecuencia es el 30 y el 32.2, contrario a los alelos 33.1, 29.2 y 34.2 que son los de menor frecuencia. En el grupo control se observaron frecuencias similares. Sin embargo, al comparar las frecuencias alélicas obtenidas entre ambos grupos, el alelo 30 es aún más frecuente que en el grupo problema con respecto al control.

Los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas comparadas para el locus D21S11 se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 17.

**Tabla 5.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D21S11 del grupo conformado por individuos sanos (control) y el grupo de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas (problema).

<b>D21S11</b>		
	<b>PROBLEMA</b>	<b>CONTROL</b>
<b>ALELO</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>
<b>27</b>	0.0075	0.007
<b>28</b>	0.09	0.08
<b>29</b>	0.172	0.16
<b>29.2</b>	0.005	0.001
<b>30</b>	0.2975	0.198
<b>30.2</b>	0.01	0.02
<b>31</b>	0.065	0.06
<b>31.2</b>	0.12	0.15
<b>32</b>	0.025	0.03
<b>32.2</b>	0.13	0.001
<b>33.1</b>	0.0025	0.003
<b>33.2</b>	0.08	0.05
<b>34.2</b>	0.005	0.001



**Figura 17.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D21S11 en el grupo control y el de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas.

## **9.5 Locus D7S820**

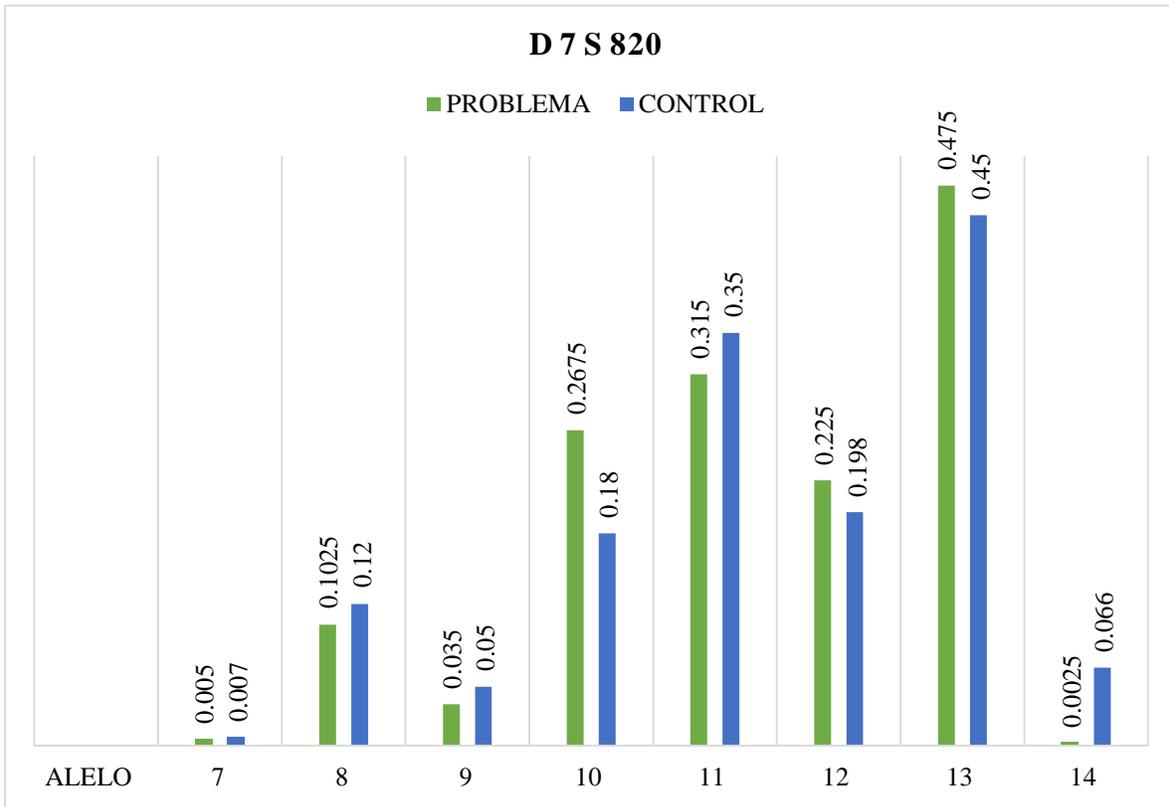
El marcador D7S820 está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.11), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (GATA)<sub>n</sub> 37.

Para el marcador D7S820 se encontró que en el grupo problema los alelos de mayor frecuencia son 10, 11, 12 y 13 contrastando con los alelos 14 y 7 que son los de menor frecuencia. En el grupo control los alelos más frecuentes son los mismos que en el grupo problema. Sin embargo, 10, 12 y 13 son aún más frecuentes en el grupo problema respecto al control a diferencia del alelo 11 que es más frecuente en el grupo control.

Los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas comparadas para el locus D7S820 se muestran en la Tabla 6 y en la Figura 18.

**Tabla 6.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D7S820 del grupo conformado por individuos sanos (control) y el grupo de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas (problema).

<b>D7S820</b>		
	<b>PROBLEMA</b>	<b>CONTROL</b>
<b>ALELO</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>
<b>7</b>	0.005	0.007
<b>8</b>	0.1025	0.12
<b>9</b>	0.035	0.05
<b>10</b>	0.2675	0.18
<b>11</b>	0.315	0.35
<b>12</b>	0.225	0.198
<b>13</b>	0.475	0.45
<b>14</b>	0.0025	0.066



**Figura 18.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D7S820 en el grupo control y el de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas.

## 9.6 Locus D5S818

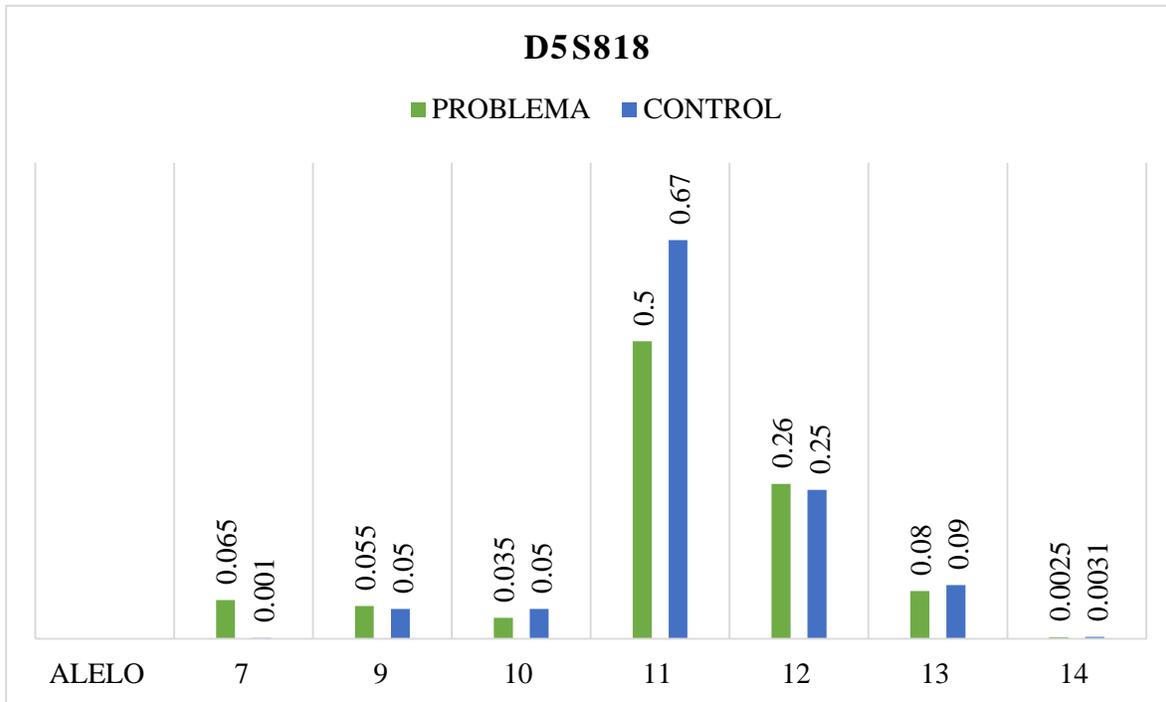
El marcador D5S818 está localizado en el brazo largo del cromosoma 8 (5q23.2), presenta repeticiones de bases tetranucleotídicas (AGAT) $n$  37.

Para el marcador D5S818 se encontró que en el grupo problema los alelos de mayor frecuencia son 11 y 12, a diferencia del alelo 14 que es el de menor frecuencia. En el grupo control los alelos más frecuentes son los mismos que en el grupo problema, los alelos menos frecuentes son el 7 y el 14. Pese a que el alelo 7 tiene menor frecuencia en ambos grupos, en el grupo control es menos frecuente. Por el contrario, el alelo 11 es más frecuente en el grupo control que en el problema.

Los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas comparadas para el locus D5S818 se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 19.

**Tabla 7.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D5S818 del grupo conformado por individuos sanos (control) y el grupo de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas (problema).

<b>D5S818</b>		
	<b>CHAGAS</b>	<b>CONTROL</b>
<b>ALELO</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>
<b>7</b>	0.065	0.001
<b>9</b>	0.055	0.05
<b>10</b>	0.035	0.05
<b>11</b>	0.50	0.67
<b>12</b>	0.26	0.25
<b>13</b>	0.08	0.09
<b>14</b>	0.0025	0.0031



**Figura 19.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D5S818 en el grupo control y el grupo problema.

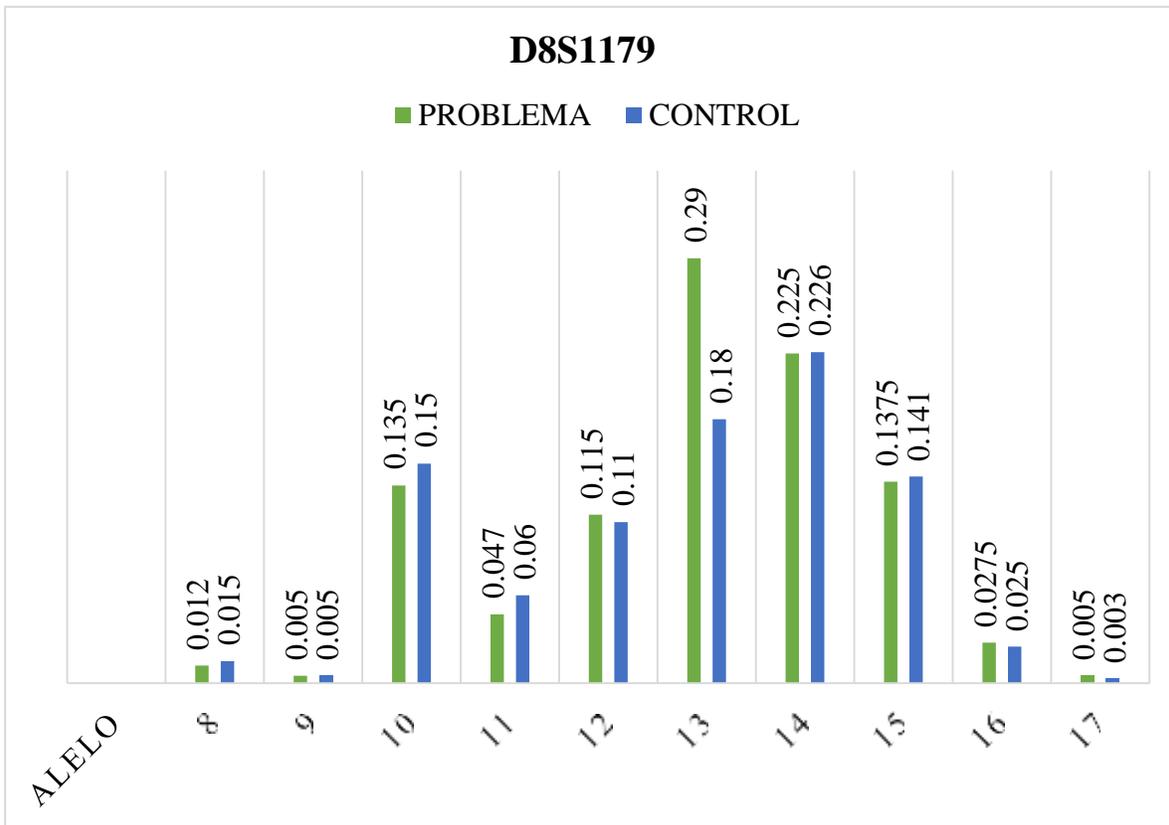
## **9.7 Locus D8S1179**

Para el marcador D8S1179 se encontró que en el grupo problema el alelo de mayor frecuencia es el 13 y los alelos 9 y 17 tienen menor frecuencia. En contraste con el grupo control, en el cual el alelo más frecuente es el 14. Respecto al alelo 13, la frecuencia es menor en el grupo control comparado con el problema.

Los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas comparadas para el locus D8S1179 se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 20.

**Tabla 8.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D8S1179 del grupo conformado por individuos sanos (control) y el grupo de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas (problema).

<b>D8S1179</b>		
	<b>CHAGAS</b>	<b>CONTROL</b>
<b>ALELO</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>	<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b>
<b>8</b>	0.012	0.015
<b>9</b>	0.005	0.005
<b>10</b>	0.135	0.15
<b>11</b>	0.047	0.06
<b>12</b>	0.115	0.11
<b>13</b>	0.29	0.18
<b>14</b>	0.225	0.226
<b>15</b>	0.1375	0.141
<b>16</b>	0.0275	0.025
<b>17</b>	0.005	0.003



**Figura 20.** Comparación entre las frecuencias alélicas del marcador D8S1179 en el grupo control y el de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas.

En la Tabla 9 se observan las frecuencias de todos los alelos de cada uno de los loci analizados en este trabajo y que son parte del panel PowerPlex 21 de Promega,

Se puede observar la presencia de alelos con una frecuencia de 0.0025, que es la menor para todo el panel; algunos de ellos son para el locus D18S51: 11, 24 y 25. Esto quiere decir que ese alelo se presentó una vez en la muestra de la población analizada.

**Tabla 9.** Frecuencias de los alelos de cada loci analizado.

ALELO	D7S820		D8S1179		D21S11		D18S51		D5S818	
	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0.005	0.007	0	0	0	0	0	0	0.065	0.001
8	0.1025	0.12	0.012	0.015	0	0	0	0	0	0
8.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0.035	0.05	0.005	0.005	0	0	0	0	0.055	0.05
9.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0.2675	0.18	0.135	0.15	0	0	0	0	0.035	0.05
11	0.315	0.35	0.047	0.06	0	0	0.0025	0.0018	0.5	0.67
11.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0.225	0.198	0.115	0.11	0	0	0.13	0.15	0.26	0.25
12.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0.475	0.45	0.29	0.18	0	0	0.105	0.105	0.08	0.09
13.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0.0025	0.066	0.225	0.226	0	0	0.172	0.175	0.0025	0.0031
14.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0.1375	0.141	0	0	0.1675	0.181	0	0
15.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0.275	0.025	0	0	0.105	0.104	0	0
17	0	0	0.005	0.003	0	0	0.1825	0.17	0	0
17.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0.05	0.15	0	0
18.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0.0275	0.03	0	0
19.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0.015	0.01	0	0
20.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0.02	0.01	0	0
21.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0.0125	0.01	0	0
22.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0.005	0.005	0	0
23.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0.0025	0.002	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0.0025	0.003	0	0
25.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0.0075	0.007	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0.09	0.08	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0.172	0.16	0	0	0	0
29.2	0	0	0	0	0.005	0.001	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0.2975	0.198	0	0	0	0
30.2	0	0	0	0	0.01	0.02	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0.065	0.06	0	0	0	0
31.2	0	0	0	0	0.12	0.15	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0.025	0.03	0	0	0	0
32.2	0	0	0	0	0.13	0.001	0	0	0	0
33.1	0	0	0	0	0.0025	0.003	0	0	0	0
33.2	0	0	0	0	0.08	0.05	0	0	0	0
34.2	0	0	0	0	0.005	0.001	0	0	0	0

## 9.8 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Con las frecuencias alélicas se aplicó la prueba de chi cuadrada para observar si los loci se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para ello, se utilizó la frecuencia del alelo al cuadrado si se trataba de homocigotos, o bien dos veces el producto de las frecuencias del alelo “p” por la del alelo “q” si se trataba de heterocigotos.

Se realizó el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. En la Tabla 10 se observa que los cinco marcadores utilizados en este estudio se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que nos indica que las frecuencias alélicas obtenidas en estos marcadores se pueden utilizar para el cálculo de diversos parámetros del área forense.

**Tabla 10.** Equilibrio de Hardy-Weinberg de los cinco marcadores analizados. Prueba  $X^2$  para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada marcador. (a) Valor de  $X^2$ : el valor obtenido de  $X^2$  para cada loci. (b) Valor de tablas ( $\alpha=0.5$ ): el valor de referencia, con un valor crítico de alfa de 0.5. RESULTADO FINAL; interpretación del resultado del análisis de chi cuadrada.

<b>LOCUS</b>	<b>VALOR DE <math>X^2</math> (a)</b>	<b>Valor de tablas<sup>(b)</sup> (<math>\alpha=0.5</math>)</b>	<b>RESULTADO FINAL</b>
<b>D7S820</b>	8.89	18.31	EQUILIBRIO
<b>D8S1179</b>	10.94	18.31	EQUILIBRIO
<b>D21S11</b>	2.91.	12.59	EQUILIBRIO
<b>D18S51</b>	21.19	41.34	EQUILIBRIO
<b>D5S818</b>	5.27	12.59	EQUILIBRIO

## 9.9 Resultados de los parámetros estadísticos.

Se realizó el análisis de parámetros estadísticos del grupo problema, los cuales se encuentran reportados en la siguiente tabla.

**Tabla 11.** Resultados de los parámetros estadísticos para el grupo problema. PD: Poder de Discriminación, PIC: Índice de contenido polimórfico, HOBS: Heterocigosidad observada, HESP: Heterocigosidad esperada, PC: Probabilidad de coincidencia, NEA: Número efectivo de alelos.

	<b>D7S82</b>	<b>D8S1179</b>	<b>D21S11</b>	<b>D18S51</b>	<b>D5S818</b>
<b>0</b>					
<b>PD</b>	0.907	0.9343	0.9508	0.9643	0.8393
<b>PIC</b>	0.7284	0.788	0.8175	0.85	0.6186
<b>HOBS</b>	0.775	0.83	0.865	0.87	0.715
<b>HESP</b>	0.7678	0.815	0.8382	0.867	0.6631
<b>NEA</b>	42.721	53.451	61.027	74.002	29.539

Se muestran los valores obtenidos de la Heterocigosidad, se observa que el marcador D18S51 es el que presenta la mayor Heterocigosidad, aportando un mayor poder de discriminación al panel. Al contrario, el marcador D5S818 que presenta el valor más bajo.

Todos los marcadores presentaron un valor alto de discriminación, los cuales al combinarse dan como resultado un enorme poder de discriminación, de tal manera que dos personas puedan ser fácilmente diferenciadas genéticamente al disminuir al mínimo la posibilidad de que existan asociaciones fortuitas.

Los valores obtenidos de índice de contenido polimórfico expresan el grado de diversidad biológica que posee cada marcador. El locus D18S51 es el que posee un mayor polimorfismo.

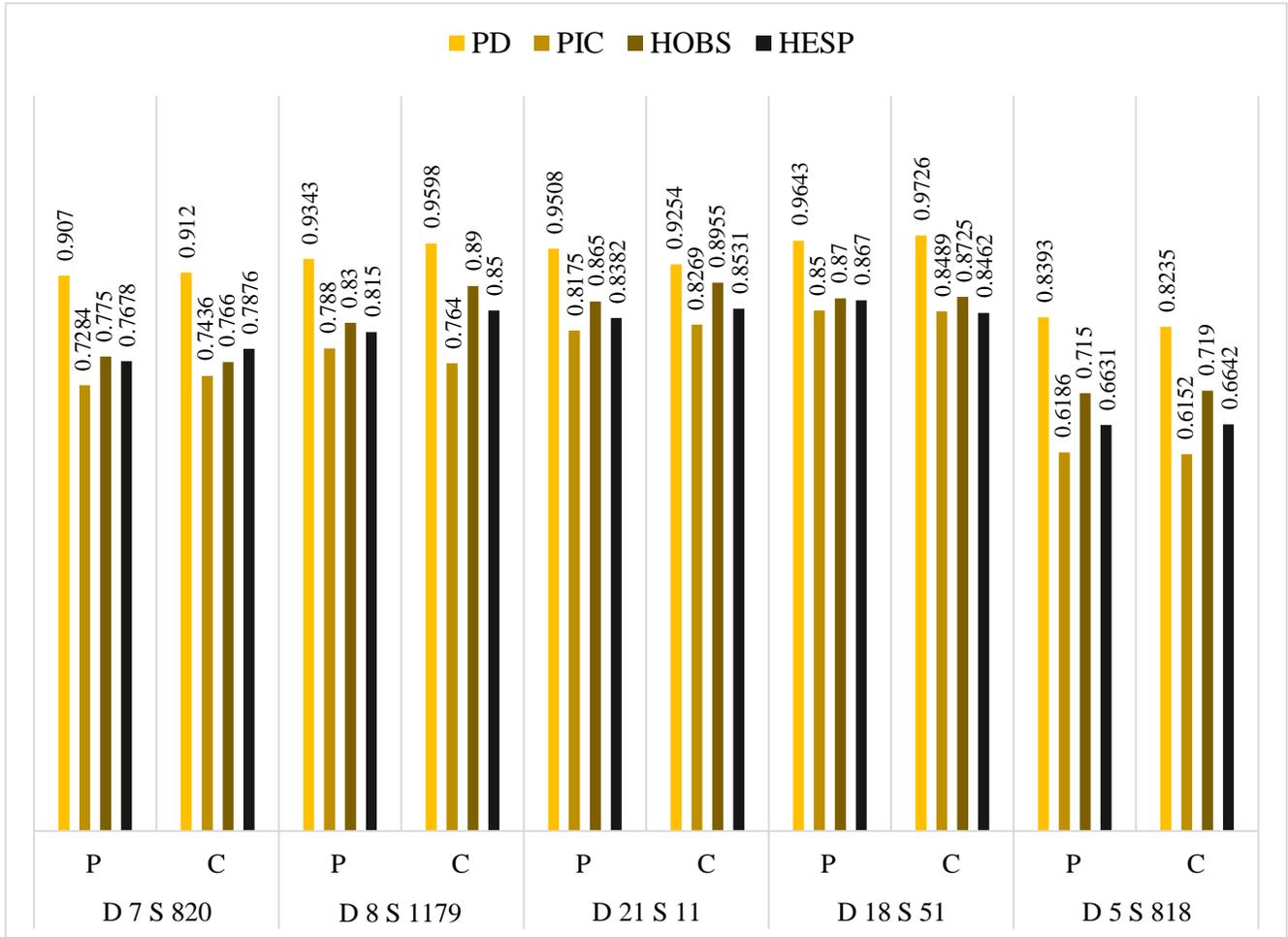
En cuanto al número efectivo de alelos, muestra a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación y los cuales son necesarios para que exista una diversidad biológica. Se observa que el marcador D18S51 es el que presenta el valor más alto.

Se realizó el análisis de parámetros estadísticos también para el grupo control, los cuales se encuentran reportados en la siguiente tabla.

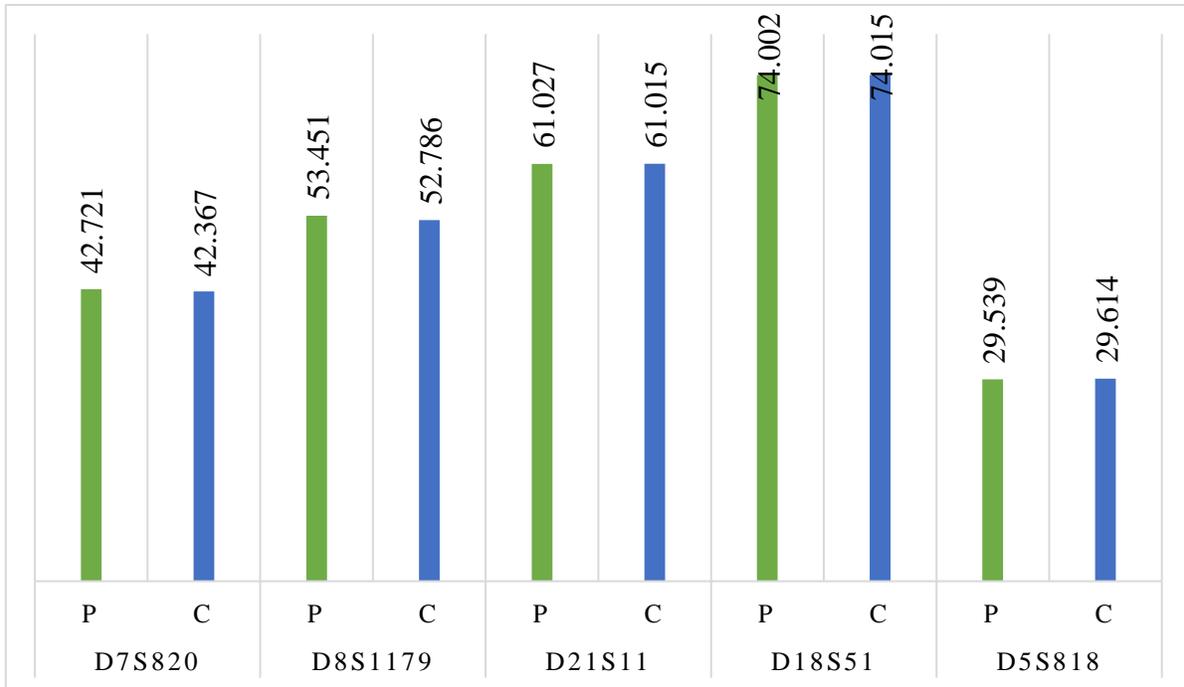
**Tabla 12.** Resultados de los parámetros estadísticos para el grupo control. Resultados de los parámetros estadísticos PD: Poder de Discriminación, PIC: Índice de contenido polimórfico, HOBS: Heterocigosidad observada, HESP: Heterocigosidad esperada, PC: Probabilidad de Coincidencia, NEA: Número efectivo de alelos.

	<b>D7S820</b>	<b>D8S1179</b>	<b>D21S11</b>	<b>D18S51</b>	<b>D5S818</b>
<b>PD</b>	0.912	0.9598	0.9254	0.9726	0.8235
<b>PIC</b>	0.7436	0.764	0.8269	0.8489	0.6152
<b>HOBS</b>	0.766	0.89	0.8955	0.8725	0.719
<b>HESP</b>	0.7876	0.85	0.8531	0.8462	0.6642
<b>NEA</b>	42.367	52.786	61.015	74.015	29.614

Como se puede observar en la Figura 21, los parámetros estadísticos entre el grupo control y el grupo problema son muy similares.



**Figura 21.** Comparación de los parámetros estadísticos del grupo problema y del grupo control.



**Figura 22.** Comparación del número efectivo de alelos entre el grupo conformado por pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas (grupo problema) y el grupo control conformado por individuos sanos nacidos en Hidalgo (grupo control).

## **X. Discusión**

De acuerdo a las investigaciones del código genético humano, Agrawal et al.<sup>74</sup> describe que dos individuos cuando son seleccionados aleatoriamente, son idénticos genéticamente en un 99,9% (aproximadamente), mientras que el 0,1% otorga la individualidad de una persona. Con este alto porcentaje de similitud genética entre individuos, se sustenta que la población utilizada como muestra para este estudio que fue de 44 participantes, es representativa para el 100% de la población del Estado de Hidalgo.

Para determinar el tamaño de la muestra del grupo control de este estudio, el cual fue de 44 muestras de pacientes con enfermedad de Chagas y 44 individuos sanos nacidos en Hidalgo, se utilizó una fórmula estandarizada usada cuando se conoce el tamaño de la población total. El último registro que se tiene documentado con el número total de habitantes del Estado de Hidalgo lo reporta el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y hace constar que hasta el año 2015 (última encuesta intercensal realizada por este organismo) se reportaba un total de 2 858 359 habitantes en Hidalgo.<sup>80</sup> De acuerdo a esta cifra y utilizando los parámetros ya especificados por la fórmula, con un nivel de confianza de 95.5% considerando un error muestral de 5%, siendo la proporción de individuos con la misma condición a estudiar, el grupo de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas al igual que a la proporción de individuos sanos nacidos en Hidalgo, se consideró un resultado de 44 personas para ambos grupos. En el caso del grupo problema (pacientes con enfermedad de Chagas), de acuerdo al Boletín Epidemiológico Nacional de la Secretaría de Salud,<sup>81</sup> en la semana 13 publicada el 9 de Abril de 2018, existen 13 pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas en etapa crónica en 2018, sumándose a los reportados en el 2017 con 53 casos, dando un total de 66 casos de pacientes con enfermedad de Chagas en Hidalgo. Para este estudio se utilizaron 44 muestras de pacientes diagnosticados para formar el grupo problema, lo que corresponde a que en este estudio se está evaluando aproximadamente al 66% de la población total de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas.

Para asegurar que se obtuvo el ADN del 100% de las muestras, se cuantificó el material en geles de agarosa al 1% para observar su integridad. Debido al tamaño de las moléculas de ADN, se recomienda utilizar agarosa para correr la electroforesis. De este modo, se comprobó que se extrajo el ADN de todas las muestras utilizadas en ambos grupos.

Actualmente, los estudios para conocer la vulnerabilidad de una población a adquirir la enfermedad de Chagas se centran principalmente en la relación que tienen sus pobladores con el insecto vector o chinche. Un ejemplo de este tipo de estudios realizados en Hidalgo es el de Gómez-Gómez et al. (2007), en el cual el objetivo fue determinar la prevalencia de infección chagásica y relacionar la misma con las características de las viviendas de la población estudiada, dando como conclusión que las condiciones consideradas como no favorables mostraban ser un notable factor de riesgo para la distribución del insecto transmisor de la enfermedad de Chagas. Otro estudio realizado en la población hidalguense que relaciona el riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas con el medio en el que se desarrollan los habitantes, es el trabajo que realizó Becerril et al. (2010), en dicho trabajo se dieron a conocer los riesgos de transmisión determinando los índices entomológicos y las características de las viviendas en localidades de Metztlán, Hidalgo. Actualmente, no existen estudios previos en Hidalgo que relacionen la adquisición de la enfermedad de Chagas con factores genéticos de la población.

La identificación de frecuencias alélicas de una población es de gran importancia para la identificación de individuos. Una vez que se ha determinado un alelo, el cual la mayoría de la población es portadora, sirve para la diferenciación entre individuos de una población respecto a los habitantes de otra. Los microsatélites son utilizados como marcadores moleculares, debido a su alto índice polimórfico, siendo aplicados no sólo en estudios de genética de poblaciones, en análisis de genéticos y en genética médica sino que además se utilizan en estudios de evolución y en la genética forense. Una ventaja de la utilización de microsatélites es que son fáciles de amplificar, lo que los caracteriza como una herramienta muy útil para la identificación de personas.

En este estudio los análisis de las frecuencias alélicas de pacientes con enfermedad de Chagas del Estado de Hidalgo fueron calculados con el propósito de determinar si existía o no una predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas.

A su vez, con las frecuencias alélicas analizadas en el grupo control, el cual está conformado por habitantes sanos nacidos en el Estado de Hidalgo, se obtuvo una base de datos con la finalidad de ser utilizada para la identificación de individuos y análisis forense.

Los resultados de las frecuencias alélicas obtenidos en este estudio muestran ciertas discrepancias entre el grupo control y el grupo problema, lo que supondría que existe una predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas. Las diferencias entre el grupo control y el grupo problema que se encontraron en este estudio se discuten a continuación:

#### **10.1 Locus D18S51, alelo 18 del grupo control con mayor frecuencia alélica en comparación con la observada en el grupo problema (pacientes con enfermedad de Chagas).**

Para el marcador genético D18S51, en el grupo problema se encontró una mayor frecuencia en los alelos 14 y 17 con una frecuencia alélica de 0.172 y 0.1825 respectivamente. Contrastando con los alelos donde se observó una menor frecuencia los cuales fueron el alelo 11 con 0.0025 y los alelos 24 y 25 con una frecuencia de 0.0025 en ambos casos. En el grupo control se observó una mayor frecuencia alélica en los alelos 11 con una frecuencia de 0.0018, el alelo 24 con 0.002 y alelo 25 con una frecuencia de 0.003. Como se puede observar, para el caso particular del locus D18S51, las frecuencias alélicas tienen una baja variabilidad en cuanto a las frecuencias alélicas observadas para ambos grupos, siendo los alelos 14 y 17 con mayor frecuencia y los alelos 11, 24 y 25 con una menor frecuencia alélica observada. Esto indica que, para el caso particular de este marcador genético analizado, no existen diferencias estadísticas significativas que puedan sustentar que existe una predisposición a adquirir la enfermedad de Chagas.

## **10.2 Las diferencias entre las frecuencias alélicas observadas en el grupo control y el grupo problema para el marcador D21S11 sugieren una predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas.**

En este marcador se observa una diferencia estadística significativa, ya que la mayoría de los alelos observados tienen una frecuencia alélica mayor en el grupo problema comparándolo con el grupo control. Este resultado sugiere que puede existir una predisposición genética en la población de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas cuando en su genoma existe la presencia del locus, ya que en el grupo problema conformado por pacientes con enfermedad de Chagas se observan frecuencias alélicas que no se reportan en el grupo control, el cual representa al resto de la población de Hidalgo. Para este marcador los alelos con una mayor frecuencia en el grupo problema fueron el 30 con una frecuencia alélica igual a 0.2975, y el alelo 32.2 con 0.13. Los alelos con menor frecuencia fueron: 29.2 con 0.005, 33.1 con 0.0025 y 34.2 con 0.005. En el grupo control los alelos 30 y 31.2 tuvieron una mayor frecuencia alélica con 0.198 y 0.15 respectivamente, contrario a los alelos 29.2, 32.2 y 34.2 con una frecuencia de 0.001 en cada caso y 33.1 con 0.003. Comparado el grupo problema con el grupo control, destacan las frecuencias alélicas observadas en los alelos 27, 28, 29, 29.2, 30, 31, 32.2, 33.2 y 34.2, las cuales tienen una mayor frecuencia alélica comparándolo con las frecuencias alélicas observadas en el grupo control.

## **10.3 El Locus D7S820 presenta diferencias estadísticamente significativas en el grupo conformado por pacientes con enfermedad de Chagas y el grupo control.**

Para el marcador D7S820, los alelos con una mayor frecuencia alélica coincidieron tanto en el grupo problema como en el grupo control. Los alelos con mayor frecuencia alélica para ambos grupos fueron el alelo 10 con una frecuencia de 0.2675 para el grupo problema y 0.18 para el grupo control, el alelo 11 con una frecuencia de 0.315 en el caso del grupo problema y el grupo control con 0.35, el alelo 12 con una frecuencia de 0.225 y 0.198 para el grupo problema y el grupo control respectivamente, el alelo 13 con un valor de frecuencia alélica de 0.475 en el grupo problema y 0.45 para el grupo control. Los alelos que tuvieron

una frecuencia alélica menor para el grupo problema fueron el 7 con 0.005 y el 14 con 0.0025 contrastando con el valor máximo reportado para el alelo 13, el cual presentó una frecuencia alélica de 0.475 siendo así en el que se observó un mayor número. Al analizar las diferencias numéricas entre ambos grupos, se observa una mayor frecuencia alélica en el alelo 14 respecto al grupo control en comparación al grupo problema. Los valores del alelo 10, al igual que el mencionado anteriormente, son más elevados en el grupo problema en comparación con los que se obtuvieron en el grupo control, lo que sugiere que existe una frecuencia alélica mayor en los pacientes con enfermedad de Chagas para el caso de este marcador y alelo en específico.

En el caso del grupo control, el alelo 7 tuvo una frecuencia alélica de 0.007, siendo el de menor valor y contrastando con el alelo 13, el cual tiene una frecuencia de 0.45. Estos contrastes entre alelos del mismo grupo coinciden de igual manera con los valores observados en el grupo problema.

#### **10.4 Locus D5S818**

Para el caso del marcador D5S818, en cuanto al grupo problema, los alelos con mayor frecuencia alélica son el 11 y el 12 con 0.50 y 0.26, respectivamente. Los alelos con menor frecuencia se reportan con un valor de 0.065 para el alelo 7 y 0.0025 correspondiente al alelo 14. En el grupo control el alelo 11 es el que presenta una mayor frecuencia alélica con un valor de 0.67 y el de menor frecuencia es el alelo 7 con 0.001 de frecuencia alélica. Para ambos grupos el alelo 11 es el que presentó una mayor frecuencia alélica. Coincide también el alelo 7 con un menor valor en ambos grupos.

## 10.5 Locus D8S1179

En el caso del marcador D8S1179, el alelo con mayor frecuencia es el 13 con un valor de 0.29. Los alelos con menor frecuencia alélica para este mismo grupo son el 9 y el 17 con 0.005 para ambos casos. En cuanto al grupo control, el alelo con más frecuencia es el 14 con un valor de 0.226 y el de menor frecuencia alélica es el 13 con 0.18.

Es importante resaltar el caso del alelo 13, el cual en el grupo problema es el que presenta una mayor frecuencia alélica comparándolo con los alelos analizados en su mismo grupo y que contrasta con el valor obtenido en el grupo control, en el cual el mismo alelo obtuvo el menor valor de frecuencia alélica siendo su valor de 0.18.

Esta última discrepancia observada entre los valores observados en el alelo 13 para ambos grupos hace suponer que existe una predisposición genética presente en la población que la hace más vulnerable a adquirir la enfermedad de Chagas.

Comparando los resultados que se obtuvieron en el grupo problema contra el grupo control en cuanto a frecuencias alélicas, existen discrepancias que hacen suponer que existe una predisposición genética de la población del Estado de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas. En marcadores como el D18S51 en el alelo 18, se observó una gran diferencia entre la frecuencia alélica del grupo problema (0.05), la cual era relativamente baja comparándola con la frecuencia del grupo control, la cual presentó un valor elevado para el mismo alelo (0.15). Representado en porcentajes, el grupo problema presentó una frecuencia alélica de 5% contra una frecuencia de 15% observada en el grupo control. Lo mismo sucede para el marcador D7S820 en el alelo 14, el cual tiene un valor de 0.0025 de frecuencia alélica para el grupo problema contra un valor de 0.66 observado en el grupo control. Esto hace suponer que la ausencia de estos alelos en los pobladores de Hidalgo los hace más vulnerables a adquirir la enfermedad de Chagas. Caso contrario a lo que ocurre en el marcador D21S11, en el cual se observó que en el alelo 32.2 se obtuvo una frecuencia alélica igual a 0.13 en el grupo problema contra un valor de 0.001, lo que indica que la presencia de este alelo en pobladores de Hidalgo puede estar relacionada con la predisposición a adquirir la enfermedad

de Chagas. Lo mismo ocurre en el locus D5S818 en el alelo 7, el cual presenta un valor de 0.065 en el grupo problema comparado con una frecuencia alélica de 0.001 observada en el grupo control. Para el marcador D8S1179, el alelo 13 presenta una frecuencia alélica igual a 0.29 contra un valor de 0.18 observado en el grupo control para el mismo alelo.

La presencia o ausencia de las frecuencias alélicas citadas anteriormente hacen suponer que existe una predisposición genética de la población del Estado de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas.

#### **10.6. Parámetros estadísticos forenses en pacientes con enfermedad de Chagas.**

Respecto a los parámetros estadísticos forenses como el Poder de Discriminación (PD), Índice de Contenido de Información Polimórfica (PIC), la Heterocigosidad observada (HOBS), la Heterocigosidad esperada (HESP), la Probabilidad de Coincidencia (PC) y el Número Efectivo de Alelos (NEA), es importante mencionar que para el empleo de los marcadores STRs en identificación humana, éstos deben presentar un poder de discriminación superior al 90% y heterocigosidad observada superior al 70%.<sup>36</sup> De esta manera, el poder de discriminación (PD) fue calculado para verificar la probabilidad de diferenciación de una muestra con las demás.<sup>46</sup> Por lo tanto, el marcador que presentó el índice más alto de PD fue el D18S51 (0.9643), seguido del D21S11 (0.9508) y del D8S1179 (0.9343). De esta forma, queda comprobada la capacidad de identificación forense de los marcadores D18S51, D21S11 y D8S1179 y su empleo en análisis de vínculo genético.

El marcador con índice más bajo de poder de discriminación (PD) en este estudio fue el D5S818 (0.8393), seguido del D7S820 (0.907). En este sentido, los marcadores D5S818 y el D7S820 no presentan un índice de poder de discriminación deseable (mayor que el 90%)<sup>38</sup>. Por otra parte, el contenido de información polimórfica (PIC) calculado para verificar la capacidad informativa de los marcadores en los estudios genéticos, se ha demostrado bastante informativo en este estudio, presentando valores significativos (mayores que 0,5) para todos los marcadores. De forma individual, se obtuvo una variación de entre 0.85 (D18S51) y

0.6186 (D5S818). El poder de exclusión (PE) se define como la probabilidad de que un sistema genético específico muestre evidencias que conduzcan a la exclusión de un sospechoso. El PE está relacionado directamente al grado de polimorfismo del marcador y, consecuentemente, también con la distribución de las frecuencias alélicas.

Según Brenner et al.<sup>82</sup>, los índices de contenido de información polimórfica (PIC) y el poder de discriminación (PD) son utilizados para conferir mayor claridad en los análisis de vínculo genético y estudios poblacionales. Por lo tanto, en este estudio, los marcadores con los índices más altos de poder de discriminación y los índices de contenido polimórfico fueron el D18S51 y el D21S11. Los índices de PIC y PD demuestran la superioridad de los marcadores microsátélites para el mapeo genético, así como su eficacia en análisis de identificación genética.

Por otro lado, la heterocigosidad observada (Hobs) refleja la frecuencia de individuos heterocigotos encontrados en la población, mientras la heterocigosidad esperada (Hesp), o también conocida como diversidad génica, representa una estimación más precisa de la heterocigosidad en la población.<sup>45</sup> La Hesp es un buen estimador de la variabilidad. Además, índices por debajo del 0,5 para la Hesp se considera insuficiente.<sup>44</sup> En este estudio, el marcador que obtuvo el índice más alto de Heterocigosidad esperada fue el D18S51 (0.867), seguido del D21S11 (0.8382). Los índices más bajos fueron observados en el marcador D5S818 (0.6631), seguido del D7S820 (0.7678). El marcador que obtuvo el índice más alto de Heterocigosidad observada fue el D18S51 (0.867), seguido del D21S11 (0.865). Los índices más bajos fueron observados en el marcador D5S818 (0.715), seguido del D7S820 (0.775). De este modo, estos marcadores podrían ser incorporados para la creación de una base de datos genéticos para la población del Estado de Hidalgo. El marcador D18S51 fue el que obtuvo los mejores índices forenses. Sin embargo, deben realizarse más análisis poblacionales para su aplicación en estudios forenses y de parentesco. Las bases de datos genéticos que contienen las frecuencias alélicas de una población específica han demostrado ser muy útiles en varios países. En países como Estados Unidos y Reino Unido estas bases se han implementado principalmente en la identificación de personas desaparecidas, con fines forenses, pruebas de paternidad, incriminación de delitos, entre otros.

En términos forenses, el marcador genético D18S51 podría ser utilizado como indicador de que un individuo pertenece a la población de Hidalgo al presentar dicho marcador en estudios genéticos basándose en los resultados que se obtuvieron en los parámetros estadísticos, ya que éste fue el que presentó más valores significativos y cumplió con los índices necesarios para que se le pueda considerar como tal.

## **XI. Conclusiones**

De acuerdo a las cifras de casos reportados de pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas en Hidalgo, existe un notable incremento en el estado, posicionándolo en los primeros lugares a nivel nacional.

La predisposición de los habitantes de Hidalgo a adquirir la enfermedad de Chagas podría no sólo depender de la interacción que presente la población con el vector sino que también podría existir un factor genético que haga más vulnerable a los habitantes.

Se observaron importantes discrepancias entre las frecuencias alélicas analizadas en el grupo problema en comparación con las observadas en el grupo control, lo que sugiere que podría existir una predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas.

Se observó que de los 5 marcadores tipo STRs analizados para la población de Hidalgo, el D18S51 es el más informativo y que más aporta para las pruebas de identificación, debido su alto índice de poder de discriminación (PD), contenido de información polimórfica (PIC), Heterocigosidad observada (HOBS) y Heterocigosidad esperada (HESP).

Con el desarrollo de este estudio, hemos podido confirmar que los marcadores genéticos tipo STRs son elementos muy útiles en el análisis forense, la identificación humana y en el mapeo genético.

Las frecuencias alélicas observadas en el grupo control sirven para crear una base de datos que pueda ser utilizada en análisis de identificación de personas, con fines forenses o para establecer parentescos.

## **XII. Perspectivas**

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos en la determinación de frecuencias alélicas de una muestra representativa de la población de pacientes con enfermedad de Chagas del Estado de Hidalgo. Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, las perspectivas a futuro se orientan hacia dos vertientes.

Como primer instancia, es necesario ampliar este tipo de estudios a nivel nacional para que de esta manera se puedan comparar las frecuencias alélicas obtenidas en pacientes con enfermedad de Chagas de diferentes estados. Lo anterior, con la finalidad de poder comprobar que además de los factores ambientales y la interacción que se presenta entre el insecto transmisor de la enfermedad y los pobladores de una región, existe una predisposición genética a adquirir la enfermedad de Chagas no sólo en pacientes nacidos en Hidalgo, sino que esta predisposición se puede presentar en la población a nivel nacional.

En segunda instancia, es necesario contar con herramientas, las cuales sirvan para facilitar la identificación de individuos. La obtención de una base de datos que contengan las frecuencias alélicas de la población de Hidalgo es de gran relevancia en el análisis forense, ya que facilita reconocer si un individuo pertenece o no a una población en específico. Al crear una base de datos de cada estado, se puede obtener una a nivel nacional que identifique a la población mexicana a nivel mundial. De esta manera, se facilita la identificación de individuos para términos forenses en pruebas de paternidad o en pruebas periciales.

### XIII. REFERENCIAS

1. Buekens et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras and México. USA. Reproductive Health. Vol. 10. 2013.
2. Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. 2002. J. Exp. Med. 185, 401–413.
3. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. USA en: Kinetoplastid Biology and Disease, Review. 2002. Pp.21.
4. Cruz, D. Perfil de antígenos HLA clase I y II y de citocinas en la enfermedad de Chagas. México, D.F. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. 2005.
5. Kirchoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero C, Delgado-Mejia M. Transfusion-associated Chagas' disease (American tripanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. Transfusion 2006;46(2):298-3
6. Náquira, C., Cabrera, R. Breve reseña histórica de la enfermedad de Chagas, a 100 años de su descubrimiento y situación actual en Perú y Latinoamérica. Rev. Perú Med Exp Salud Pública. 2009; 26(4): 494-504.
7. Ceuz, O. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst 2010;1:159-218.
8. Salazar-Schettino et al. Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) Buenos Aires. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM Ministerio de Salud de la Nación, 2012.
9. Wendel S, Brener ME, Carmargo A, Rassi. A. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brasil 1992.
10. Moncayo A. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1):401-4.
11. Rossi MA, Ramos SG. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. Am Heart J. 1996;132(1):207-10.
12. Acquatella H. Patología del corazón de origen extracardíaco. Avances recientes en miocardiopatía chagásica. Rev Esp Cardiol. En: Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. Sociedad Argentina de Cardiología. Rev Argent Cardiol. 2011;79(6): 544-64.
13. Oswaldo Cruz. Chagas C. Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiologicos e clinicos. Mem Inst 1911;3(2):219-75.
14. Cruz, O., Villela, E. Forma cardíaca da *Trypanosomíase* Americana. Mem Inst 2012; 14:5-61.
15. Secretaría de Salud Pública. Boletín Epidemiológico Nacional. 2018. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2018/sem14.pdf>, <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/316685/sem14.pdf>

16. OMS/A62/17/2011. 62ª Asamblea Mundial de la Salud. Enfermedad de Chagas: control y eliminación, 20 de marzo de 2009. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=15377&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15377&Itemid=)
17. OMS/A63/17/2010. 63ª Asamblea Mundial de la Salud. Enfermedad de Chagas: control y eliminación, 22 de abril del 2010. Disponible en: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA63/A63\\_17-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-sp.pdf)
18. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases, Enero de 2013. Disponible en: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564540/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/)
19. Secretaría de Salud Pública. Boletín Epidemiológico Nacional. 2015. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem01.pdf>, <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE01.pdf>, <http://pda.salud.gob.mx/cubos/cmortalidadxp.html>
20. Strachan T, Read AP, Genética Molecular Humana. Porto Alegre: ArtMed.
21. Piqueras, J.F. et al. Genética. 2002. Ariel Ciencia. España. 474 pp.
22. Watson JD y Crick FHC Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171: 737-738. 1953.
23. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC, Genética Moderna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
24. Albert, B. et al. Molecular Biology of the cell. Cuarta Edición. Garland Science. Nueva York. 2002
25. Muegge K. Modifications of histone cores and tails in V(D)J recombination. USA. *Genome Biology*. Vol 4. 2003.
26. Dimitri, Patrizio et al. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma*. USA. Vol. 118. 2009.
27. Mattei, J. El genoma humano (Ethical eye: the human genome). Colección La Mirada de la Ciencia. Editorial Complutense. Madrid, España. 201. 2002
28. Lorente AM, Lorente JA, Cañadas EV, La tecnología del ADN en Medicina Forense: importancia del indicio y del lugar de los hechos. USA. *Cuad Med Forense* 14: 3-7. 1996
29. Brown TA. Clonagem génica e análise de DNA. Porto Alegre: Artmed 3. 2003
30. Bini C, et al. Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five italian population samples: A collaborative study. USA *Forensic Sci Int* 153: 231-6. 2005
31. Gomes I, Prinz M, et al. Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex. *Int J Legal Med* 121: 198-203. 2007
32. Pereira R, Gomes I, Amorim A, Gusmão L. Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int J Leg Med* 121: 192-97. 2007
33. Griffiths AJF. et al. Genética Moderna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
34. Strachan T, Read AP. Genética Molecular Humana. Porto Alegre: ArtMed. 2002.
35. Monson KL, Miller KWP, Wilson MR, DiZinno JA, Budowle B. The mtDNA Population Database: An Integrated Software and Database Resource for Forensic Comparison. *Forensic Sci Com*. 2002

36. Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6754-58. 1980
37. Butler, J.M. DNA Biology Review, in forensic DNA Typing/ Biology, Technology, and Genetics of STR markers. 2005. [Sección del libro] // Forensic DNA typing / aut. libro Butler John M. ed. Elsevier. USA
38. Hernández Rodríguez, A. W., Trejo Medinilla F. Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. 2014. Vol. 10. Archivos de Medicina. México.
39. Bell GL, Selby MJ, Rutter WJ. The Highly Polymorphic Region Near the Human Insulin Gene is Composed of Simple Tandemly Repeating Sequences. 2010. Vol. 295 Nature. Pp. 31-35.
40. Thompson MW, McInnes RR y Willard HF. Genetics in Medicine 5<sup>th</sup> edition. 1994. WB Saunders Company. USA
41. Lorente Acosta, J.A. Un detective llamado ADN. España. Ediciones Temas de Hoy, S.A. 1<sup>a</sup> edición. 250 páginas. 2004.
42. Entrala, C. Técnicas de análisis del ADN en Genética Forense. Laboratorio de ADN forense, Depto. de Medicina Legal Universidad de Granada, España. España. 2005.
43. Aranguren Méndez, J. A. et al., Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. 2005. Vol. 1. Arch. Latinoam. Product. Anim. Facultad de Ciencias Veterinarias. Venezuela.
44. UVIGEN: Unidad Vinculante Interdisciplinaria de Genética. [Internet] Uruguay. UVIGEN 2003. Citado el 05 de Octubre de 2016. Disponible en: <http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/Popgen/popintro.html>
45. Rodríguez Carlin, C., et al. Genética forense. 2010. Año 2, Número 4 Revista Fuente. México.
46. Acquadro, A. et al. Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. 2005. Vol. 48. Genoma. Canadá. Pp. 217-224.
47. Aguilar Ruiz, M.O. Bases de Datos Criminalísticos en la Procuraduría General de la Republica. 2010. Biblioteca Jurídica Virtual del Instituto de Investigaciones Jurídicas de la UNAM. México.
48. Piñero, D., et al. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México. 2008. Vol. I Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.
49. Jiménez Sánchez, G., Silva Zolezzi, I., Hidalgo, A., March, S. La medicina Genómica en México: los primeros pasos y el camino por recorrer. 2010. Instituto Nacional de Medicina Genómica. México.
50. Mazzotti L. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el País: Demostración de Tripanosomas en los reduvídeos transmisores. 1936. Medicina. México. Vol. 286. Pp. 584- 585.
51. Ramsey, J.M., L.A. Tello y J.L. Pohls. Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. En: J. M. Ramsey, A. Tello-López, J. L. Pohls (Eds.), Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México. 2003. Pp 85-101. México.

52. Wolfgan, K.J., P.H. Willet y A. Bernard. Microbiología. 1994. Editorial Médica Panamericana. 1600 p.
53. Benítez-Alva, J. I. Distribución de triatóminos (Heteroptera: Reduviidae) asociados a la vivienda humana y posibles zonas de riesgo en seis estados de la República Mexicana. 2006. Vol. 5. BIOCYT. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 327- 340. México.
54. Jiménez Sánchez, G. Mapa del Genoma de Poblaciones Mexicanas. Segunda edición. Ciudad de México. Talleres Gráficos de México, 2010.
55. McClean, Ph. Mendelian Genetics [En línea] = Mendelian Genetics // Mendelian Genetics. [Consultado 29 de septiembre de 2009]. <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/mendel/mendel4.htm>.
56. Silva Zolezzi, I., et al. Análisis de la diversidad genómica en las poblaciones mestizas mexicanas para desarrollar medicina genómica en México. 2009. PNAS Early Edition. México.
57. Desgarenes- Alcalá, C.M. et al. Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes CAPN1 Y CAST asociados a la calidad de la carne en bovinos de la Cuenca del Papaloapan. *Nova scientia* [online]. 2017, vol.9, n.19, pp.211-228. ISSN 2007-0705
58. Macías Vega, M. et al., 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 centro de México. 2013. Vol. 39. Revista Española de Medicina Legal. Elsevier. Pp. 48- 53. España.
59. Guardado Estrada, M. et al., Diversidad genética en la población mexicana: Utilización de marcadores de ADN. 2008. Vol. 71. Revista Médica del Hospital General de México. Pp. 162- 174. México.
60. Rangel-Villalobos, Rivas, Torres-Rodríguez et al. Allele frequency distributions of six Amp-FLPS (D1S80, APO-B, VWA, TH01, CSF1PO and HPRTB) in a Mexican population. 1999. Vol. 105. Forens Sci Int. Pp. 125-129. USA
61. Secretaría de Salud Pública. Boletín Epidemiológico Nacional. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2012/sem01.pdf>, <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2012/BOL-EPID-2012-SE01.pdf>, <http://pda.salud.gob.mx/cubos/cmortalidadxp.html>
62. Secretaría de Salud Pública. Boletín Epidemiológico Nacional. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/261953/sem39.pdf>
63. Salazar-Schettino PM et al. A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in México. 2010. Vol. 1. J Selva Andina Res Soc. Pp. 57-80.)
64. Sosa-Jurado F. et al. Electrocardiographic Findings in Mexican Chagasic Subjects Living in High and Low Endemic Regions of *Trypanosoma cruzi* Infection. 2003. Vol. 98. Mem Inst. Oswaldo Cruz. Pp. 605-610.
65. Gaspar, E. Genómica funcional de transportadores de aminoácidos y poliaminas de *Trypanosoma cruzi* Canepa, 2010. Facultad de Ciencias Exactas y Funcionales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
66. Barrett MP et al. The trypanosomiasis. 2003. Vol. 362. Lancet. Pp. 1469–1480. USA

67. Barrett MP, Gilbert IH. Targeting of toxic compounds to the trypanosome's interior. 2006. Vol. 63. *Advances in Parasitology*. Pp. 125-183. USA
68. Riera C, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): A case report. 2006. Vol. 75. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. España.
69. Monson KL, Miller KWP, Wilson MR, DiZinno JA, Budowle B, (2002) The mtDNA Population Database: An Integrated Software and Database Resource for Forensic Comparison. *Forensic Sci Com*
70. Strachan T, Read AP, (2002) *Genética Molecular Humana*. Porto Alegre: ArtMed.
71. Pena SDJ, (1993) Breve introdução ás impressões digitais de DNA. *Rev Bras Genet* 16: 856-867.
72. Tay, J. et al. Estado Actual de nuestros conocimientos sobre la enfermedad el Chagas en la República Mexicana. Brasil. Vol. 16. *Revista de Sociedades Brasileñas de Medicina Tropical*. Pp. 30-66. 2008.
73. Gourraud PA, Mano S, Barnette T, Carrington M, Inoko H, Cambon-Thomsen A, Integration of microsatellite characteristics in the MHC region: a literature and sequence based analysis. *Tissue Antigens* 64: 543-55. 2004
74. Agrawal S, Khan F, Nityanand S, Short tandem repeat technology has diverse applications: individual identification, phylogenetic reconstruction and chimerism based post haematopoietic stem cell transplantation graft monitoring. *Indian J Med Sci* 58: 297-304. 2004
75. Aguiar VR, Wolfgramm EV, Malta FS, Bosque AG, Mafia A, Almeida VC, Caxito FA, Pardini VC, Ferreira AC, Louro ID, Updated Brazilian STR allele frequency data using over 100,000 individuals: An analysis of CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX and vWA loci. *Forensic Sci Int Genet* 6: 504-9. 2012
76. Whittle MR, Romano NL, Negreiros VAC, Updated Brazilian genetic data, together with mutation rates, on 19 STR loci, including D10S1237. *Forensic Sci Int* 139: 207-10. 2004
77. Grattapaglia D, Schimidt AB, Costa SC, Stringher C, Fernandes AP, Ferreira ME, 2001. Brazilian population database for the 13 STR loci of the AmpFISTR Profiler Plus and Cofiler multiplex kits. *Forensic Sci Int* 118: 91-94.
78. Secretaría de Salud Pública. Boletín Epidemiológico Nacional. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264542/sem40.pdf>
79. Foissac, A. et al. Microsatellites in the HLA región. *Forensic. Sci Int*. 142: 209-211.
80. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/hgo/poblacion/> 2018.
81. Secretaría de Salud Pública. Boletín Epidemiológico Nacional. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/314582/sem13.pdf>
82. Brenner, N. et al. Dynamics of protein distributions in cell populations. 2006. *Phys Biol* 2 (3): 172- 82

## XIV. ANEXOS

### 14.1 Consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título de proyecto: DETERMINACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS DEL ESTADO DE HIDALGO**

Estimado(a) Señor/Señora:

#### **Introducción/Objetivo:**

El Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en colaboración con el Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y la Clínica 32 del Instituto Mexicano del Seguro Social realizará un estudio determinando las frecuencias alélicas en pacientes diagnosticados con enfermedad de Chagas e individuos sanos nacidos en el Estado de Hidalgo. El objetivo del estudio es determinar las frecuencias alélicas en pacientes con enfermedad de Chagas e individuos sanos nacidos en Hidalgo. El estudio se está realizando en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo obteniendo las muestras sanguíneas en la Clínica 32 del IMSS, procesando las mismas en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa UA EH) y en el Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

#### **Procedimientos:**

Si Usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

Le haremos algunas preguntas acerca de su lugar de nacimiento, tanto de usted como de sus padres y abuelos. Se le realizará una toma de muestra sanguínea vía intravenosa. Dicha muestra será tomada por especialistas y utilizando siempre material nuevo, esterilizado y desechable. Esta muestra se realizará en el área de Epidemiología de la Clínica 32 del IMSS.

**Beneficios:** Usted no recibirá un beneficio directo por su participación en el estudio, sin embargo, si usted acepta participar, estará colaborando con la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

**Confidencialidad:** Toda la información que Usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

**Riesgos Potenciales/Compensación:** Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hicieran sentir un

poco incomodo(a), tiene el derecho de no responder. Al obtener la muestra sanguínea usted corre el riesgo de presentar un pequeño moretón o dolor en el momento de la punción. Es importante recalcar que el material utilizado en la toma de muestra es nuevo, se encuentra debidamente esterilizado y es desechable, por lo cual se utilizará únicamente una vez. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio y tampoco implicará algún costo para usted

**Participación Voluntaria/Retiro:** La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo le tratan en la Clínica 32 del IMSS.

**Números a Contactar:** Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto: Felisa Mariel Antelis Barrera al siguiente número de teléfono 771 178 0321.

Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

**Consentimiento para su participación en el estudio**

Su firma indica su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.

Nombre del participante:

\_\_\_\_\_

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre Completo del Testigo 1:

\_\_\_\_\_

Dirección

\_\_\_\_\_

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año

Firma: \_\_\_\_\_

Relación con el participante \_\_\_\_\_

Nombre Completo del Testigo 2:

\_\_\_\_\_

Dirección

\_\_\_\_\_

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año

Firma: \_\_\_\_\_

Relación con el participante \_\_\_\_\_

Nombre de la persona que obtiene el consentimiento

\_\_\_\_\_

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año