



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

ESTUDIO DE INDELS AUTOSÓMICOS DE USO FORENSE EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE LA REGIÓN DEL PACÍFICO COLOMBIANO

Anyi Marcela González Molina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad De Medicina
Maestría En Genética Humana
Bogotá D.C, Colombia
2018

ESTUDIO DE INDELS AUTOSÓMICOS DE USO FORENSE EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE LA REGIÓN DEL PACÍFICO COLOMBIANO

Anyi Marcela González Molina

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Genética Humana

Director (a):

Candidato a PhD., MSc, Bioquímico. Mauricio Rey Buitrago

Línea de Investigación:

Genética Humana y Forense

Universidad Nacional de Colombia

Facultad De Medicina

Maestría En Genética Humana

Bogotá D.C, Colombia

2018

A Dios por ser lo más importante y lo primero en mí vivir, conocerle ha sido el mejor regalo inmerecido.

A mi princesa hermosa, respuesta de Dios: Eliette Ángel González, A mi esposo Oscar por ser mi bastón y mi apoyo incondicional y A mis padres y hermanos que amo como a mi vida.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido producto del esfuerzo y de sacrificios no sólo míos sino de los que hacen parte de mi vida, por eso en primer lugar quiero agradecer a Dios quien siempre fue mi mayor inspirador y motivador, a mi esposo Oscar por su comprensión y ayuda, a mis padres Fernando y Flor lo más importante después de mi esposo y mi hija y quienes me enseñaron que todo lo que se inicia debe culminarse, a mis hermanos Tatiana y Jair por ser ese ejemplo de esmero y sacrificio en verdad son admirables, al profesor Mauricio Rey quien de manera voluntaria con su conocimiento aportó para que este proyecto fuera realidad. A mis amigos cercanos por su apoyo incondicional, a la Fiscalía General de la Nación por que sin el apoyo económico brindado no hubiera sido posible ejecutar la parte practica de laboratorio, a la coordinadora de grupo de trabajo y a mis compañeros del Grupo Genética CTI-DN por todos sus aportes.

Resumen

El multiplex de marcadores genéticos de inserción/ deleción (Indels) sirve como una herramienta complementaria a los STR muy útil para identificación. Se conoce en el comercio el kit de la casa comercial Qiagen *DIPplex® Investigator*, donde se encuentra un multiplex de 30 Indels bialélicos autosómicos y el marcador de la Amelogenina para uso forense.

Se realizó un estudio genético con un total de 201 muestras de individuos no relacionados hombres y mujeres en cuatro departamentos de la población del Pacífico colombiano: Nariño (64 Individuos), Cauca (50 Individuos), Chocó (56 Individuos) y valle del Cauca (31 Individuos) utilizando el kit *DIPplex®*.

No se encontraron desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg en la mayoría de Indels para las cuatro poblaciones. Las Probabilidades de Coincidencia (PC) estaban en los rangos (0.3354-0,5683) para Nariño, (0.3361-0.5740) para Cauca, (0.3466-0.4910) para Chocó y (0.3338-0.4828) para Valle del Cauca respectivamente, y el Poder de Exclusión (PE) fue > 0.99 . La PCR multiplex se optimizó para una solución a mitad de volumen final de 12,5 ul, se obtuvieron perfiles completos para las 201 muestras con un rendimiento excelente.

El kit *DIPplex®* se puso a prueba en muestras de tipo forense (Restos óseos) con fines de identificación de las cuales no se habían obtenido resultados concluyentes con STRs de rutina, obteniéndose un perfil completo para los 30 Indels por tanto este estudio demuestra que el multiplex de Indel es un método eficaz para complementar los STR en casos de aplicación forense para la población de la Región del Pacífico colombiano.

Palabras clave: (Indel, Autosómico, Nariño, Chocó, Cauca y Valle del Cauca).

Abstract

The insertion / deletion marker multiplex (Indels) serves as a complementary tool to STRs that is very useful for identification. The kit of the commercial house Qiagen DIPplex® Investigator is known in the trade, where is a multiplex of 30 Indels bialélicos autosómicos and the marker of the Amelogenina for forensic use.

A genetic study was carried out with a total of 201 samples of unrelated men and women in four departments of the Colombian Pacific population: Nariño (64 individuals), Cauca (50 individuals), Chocó (56 individuals) and Valle del Cauca 31 Individuals) using the DIPplex® kit.

No deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were found in the majority of Indel for the four populations. The Coincidence Probabilities (PC) were in a range of Nariño (0.3354-0.5683), Cauca (0.3361-0.5740), Chocó (0.3466-0.4910) and Valle del Cauca (0.3338-0.4828), and the Power of Exclusion PE) was > 0.99 . Multiplex PCR was optimized for a final half-volume solution of 12.5 ul PCR, complete profiles were obtained for the 201 samples with excellent yield. This study demonstrates that Indels multiplex is an effective method to complement STRs in forensic applications for the population of the Colombian Pacific Region.

Keywords: Indel, Autosomal, Nariño, Chocó, Cauca y Valle del Cauca

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Introducción	1
1. Qué son los Indels y su papel como estrategia complementaria a los marcadores usados de rutina en genética Forense.....	5
1.1 Aporte de los Indel a la Genética Forense	8
1.1.1 Marcadores STR rutinarios en Forense.....	10
1.2 Ventajas de los marcadores Indels de uso Forense.....	11
2. Desarrollo de la técnica científica para el estudio de Indels en la población de la Región del Pacífico colombiano.....	13
2.1 Proceso histórico y de Mestizaje En La Región Pacífica.....	14
2.2 Metodología del Trabajo de Investigación.....	19
2.1.1 Extracción de ADN	19
2.1.2 PCR-RealTime para la Cuantificación de ADN	20
2.1.3 Tipificación y Análisis de Indels	20
3. Resultados de las frecuencias alélicas para los Indels en los cuatro departamentos.....	26
3.1 Resultados y discusión de datos estadísticos y parámetros forenses	33
3.1.1 Análisis de Estructura en la Región Pacífica colombiana.....	36
3.2 Conclusiones	40
4. Análisis en muestras de tipo forense para identificación humana.....	43
4.1.1 Extracción de ADN de resto óseo	44
4.1.2 PCR-RealTime para la Cuantificación de ADN.....	44
4.1.3 Tipificación y Análisis de STR e Indels	44
4.2 Evaluación del método en casos de Identificación humana sin resultados o con escaso ADN	45
4.3 Resultados y discusión de los análisis del resto óseo	47
5. Conclusiones y recomendaciones.....	53
5.1 Conclusiones generales.....	53
5.2 Recomendaciones	55
Anexo 1: Consentimiento Informado	57

XII ESTUDIO DE INDELS AUTOSÓMICOS DE USO FORENSE EN UNA MUESTRA
DE LA POBLACIÓN DE LA REGIÓN DEL PACÍFICO COLOMBIANO

Bibliografía 61

Lista de figuras

Figura 1-1 Electroferograma de Indels del kit DIPplex® para un Resto óseo.....	7
Figura 1-2 Perfiles completos obtenidos con la línea celular T150 (B) en una concentración de 0.062 ng/μL. Wei, et al. (2014).	8
Figura 1-3 Comparación de la secuencias de STR, SNP e INDELS. Gusmaõ L. et al., (2012).....	9
Figura 3-1 2Mapa de Colombia mostrando los departamentos de la Región del Pacífico colombiano donde se obtuvieron las muestras biológicas.	27
Figura 3-2 Graficas de barras para los valores Q de asignación de individuos para una, dos y tres agrupaciones K.	38
Figura 4-1 Imagen del Resto óseo analizado	46
Figura 4-2 Electroferograma de STR del kit PowerPlex Fusion® para un Resto óseo ..	49
Figura 4-3 Electroferograma de Indels del kit DIPplex® para un Resto óseo.....	51

Lista de Tablas

Tabla 2-1	21
Tabla 2-2	23
Tabla 2-3	23
Tabla 2-4	24
Tabla 3-1	28
Tabla 3-2	29
Tabla 3-3	30
Tabla 3-4	31
Tabla 3-5	35
Tabla 3-6	37
Tabla 3-7	38

Introducción

El siguiente trabajo se desarrolló basado en el aporte a las ciencias forenses, a través del uso de los Indels (por sus siglas en inglés deletion-Insertion), con el fin de dar a conocer la utilidad de estos marcadores genéticos aplicables al campo genético, donde, gracias a su forma de transmisión y composición molecular se convierten en un excelente complemento para el análisis de escenarios a nivel de la criminalística.

En Colombia se cuenta con escasa información relacionada con las frecuencias alélicas estimadas para los Indels autosómicos de regiones no codificantes del genoma en las diferentes poblaciones del país, los estudios más recientes publicados para estos marcadores son los basados en el análisis de ancestría en comunidades indígenas Embera y en la población de San Basilio de Palenque, Cartagena, Builes *et al.* (2013) y los estudios basados en cromosoma X, Ibarra *et al.* (2014).

Las publicaciones científicas para otro tipo de marcadores genéticos como los STR hacen particular referencia a poblaciones geográficas con asentamientos indígenas, donde se observa a nivel genotípico una aparente variación de la estructura genética de sus componentes poblacionales en el sur-occidente y el centro del país, Rondón *et al.* (2008), además se encuentran publicados estudios menos recientes en la población colombiana con STR usados en el sistema CODIS, Paredes, *et al.* (2003) y otros análisis de marcadores moleculares genéticos que están a disposición del público para Colombia que se basan en el Cromosoma Y para el departamento del Caribe Builes *et al.* (2005), otras fuentes de ADN como el mitocondrial en afrocolombianos Keyeux *et al.* (2003) y análisis de STR autosómicos en poblaciones del Caribe Carracedo, *et al.* (2003), sin embargo escasean las publicaciones referentes a frecuencias alélicas de marcadores autosómicos Indels de la población Colombiana.

La genética forense aporta indiscutiblemente con gran relevancia a la criminalística, sobre todo en los casos de filiación biológica y en la identificación humana de personas desaparecidas, ya que al basar las investigaciones judiciales en el estudio del ADN, se ha visto que tan solo una pequeña parte de esta molécula diferencia una persona de otra, ya que es la responsable de portar la información genética de un individuo, por ello su implementación se realiza con mucha fiabilidad. Corach y Cols *et al.* (1995) dijeron que al analizar los polimorfismos del ADN en una investigación de tipo forense donde la evidencia biológica dejada en el lugar de los hechos se puede comparar con las diferentes víctimas, por tanto, los grupos de Genética Forense emplean técnicas que continuamente mejoran y evolucionan para facilitar el análisis y cada día surge nueva tecnología que facilita la labor forense a nivel mundial, más aun evidenciándose el incremento de la violencia, atentados, masacres y desastres naturales en el mundo.

No es desconocido el tema de la violencia en Colombia y el nacimiento de bandas criminales a nivel nacional, esto ha llevado a los diferentes entes involucrados a buscar mecanismos para la resolución del conflicto y la reparación de las víctimas. A mediados de los años 90, se agudizó en la región del Pacífico colombiano el conflicto armado, la población civil quedó en medio de la confrontación entre guerrillas y paramilitares dejando como resultado miles de asesinatos y centenares de desaparecidos. Uno de los casos que más ha marcado esta población es la masacre de Bojayá-Chocó en mayo de 2002 donde en el interior de la iglesia del municipio 119 personas entre adultos y niños murieron tras la explosión de un cilindro bomba lanzado por miembros del bloque 58 del grupo guerrillero Fuerzas Armadas Revolucionarias de Colombia (FARC-EP), de los cuales a la fecha aun existen cuerpos sin identificar; esta masacre tuvo lugar en el marco de los enfrentamientos que se desarrollaron entre las FARC-EP y los paramilitares de las AUC, por el derecho a mantener el control de la zona y el acceso al río Atrato.

Después de 20 años de conflicto a nivel nacional, surge un escenario de dialogo entre el Gobierno colombiano y las Fuerzas Armadas Revolucionarias de Colombia (FARC) llamado “Los Acuerdos de la Habana”, los cuales fueron ratificados y firmados en octubre de 2016, por tanto, esto indica que los civiles nativos del Pacífico que se vieron en condición de desplazamiento, tienen la oportunidad de volver a ocupar territorios abandonados y así mismo retomar la búsqueda e identificación de personas desaparecidas en todo el país.

En el contexto socio-cultural Colombia ante el mundo por décadas ha mostrado una imagen de tinte violento según Hoffmann *et al.* (2007), es así, que ha surgido una disciplina conocida como “violentología” como su nombre lo indica corresponde al estudio científico de la guerra como fenómeno social, así lo afirma Pissot y Gouëset., (2002) la cual hace referencia a la escuela de sociólogos e historiadores en Colombia, los violentólogos, dedicados a estudiar la violencia política y la guerra civil colombiana, Orlando Fals Borda sociólogo Barranquillero, es uno de los iniciadores de dicha corriente en los años sesenta, Colpas *et al.* (2014).

Al considerar el panorama social del país y a su vez de la Región Pacífica surge la inminente necesidad de apoyar la administración de justicia en los casos de identificación e individualización humana, resolución de delitos criminales y de filiación biológica, con el aporte de la genética Forense y el desarrollo de técnicas que ofrezcan ventajas tanto en aspectos analíticos como técnico-científicos basados en marcadores moleculares genéticos, que sean de fácil automatización con tecnología de alto rendimiento.

El uso de marcadores genéticos como los Indels (Inserción/Delección) abre una gran perspectiva en la investigación científica de la genética Forense, debido a sus amplias ventajas entre otras, que son polimorfismos de longitud generados por inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos en el genoma, además de mostrar baja tasa mutacional y poseer un tamaño de amplicón corto y se ha encontrado alta tasa de éxito en la amplificación de ADN en estado de degradación como lo describe Ülo Väli *et al.* (2008). En años recientes la investigación científica del área forense y más precisamente la genética se ha enfocado en el análisis de marcadores genéticos que puedan complementar los convencionales STRs, es así como se ha mostrado un amplio interés en los Indels, pues, permiten amplificar en una PCR multiplex alrededor de 30 marcadores simultáneamente, no requieren alto costo para su estandarización, su herencia es biparental (autosómica) lo cual permite que el 50% de la información de genotipificación obtenida corresponda a uno de los progenitores, por tanto en casos de filiación biológica, paternidades e identificación de personas resultan adecuados.

En los últimos años el estudio de marcadores moleculares como los Indels han inspirado la realización de investigaciones científicas destacadas, es así, como Weber *et al.* (2002) con sus colaboradores identificaron y caracterizaron alrededor de 2000 Indels bialélicos en la población humana, dando como resultado el hallazgo de abundantes Indels en el genoma y mostraron la facilidad de análisis en este tipo de marcadores, complementariamente Mills y colaboradores reportaron la presencia de un Indel cada 7.2 kb de densidad en el genoma, Mills *et al.* (2006).

Habiendo ya descrito la variada gama de ventajas que proporcionan los Indels en investigación forense, con este estudio, se busca aportar al campo científico el análisis de frecuencias alélicas de marcadores genéticos Indels autosómicos, parámetros de uso forense como Poder de Discriminación (PD), Poder de Exclusión (PE), entre otros, en la población de la Región del Pacífico colombiano, donde se incluyen muestras de individuos no relacionados nacidos en los departamentos del Cauca, Nariño, Valle del Cauca y Chocó y como resultado del estudio cooperar con la resolución de casos forenses de filiación biológica, identificación de personas desaparecidas y casos criminalísticos que requieran análisis de ADN en el pacífico colombiano.

1. Qué son los Indels y su papel como estrategia complementaria a los marcadores usados de rutina en genética Forense

Los Indels son variaciones de longitud de ADN naturales expresadas en dos estados: la presencia (inserción) o ausencia (delección) de uno o más nucleótidos en el componente genético de los individuos, se encuentran de forma abundante en los genomas de diferentes modelos animales, por tanto, es de esperar que sean abundantes en el genoma de los seres humanos, se ha descrito que estos polimorfismos representan del 16 al 20% de todos los polimorfismos del genoma humano, Weber *et al.* (2002).

Los Indels se caracterizan por ser bialélicos y a su vez los alelos pueden variar en sus secuencias, en casos raros, la diferencia de longitud entre los alelos puede ser decenas o incluso cientos de pares de kilobases, sin embargo el grupo más grande de Indels bialélicos, lo conforman los que tienen diferencias de longitud alélica con relativamente pocos nucleótidos.

Estudios de variación genética en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* han demostrado que los Indel representan entre el 16 % y 25 % de todos los polimorfismos genéticos en estas especies así lo describe Zarse *et al.* (2007). En contraste estudios realizados analizando la variación genética en el cromosoma 22 humano demostraron que los seres humanos poseen niveles similares de variación de tipo Indels (Polimorfismos de inserción/delección) al representar el 18 % de los polimorfismos en este cromosoma.

Otros estudios han mostrado que al utilizar datos de re-secuenciación se han podido identificar alrededor de 415.436 Indels segregándose en poblaciones humanas y se estima

que de los aproximadamente 10 millones de polimorfismos conocidos en los seres humanos, cerca de 1,5 millones representan Indels.

Esto indica que los Indels podrían ser una clase de marcadores genéticos muy comunes en modelos no humanos, especialmente dado por la diversidad genética en muchas poblaciones naturales.

Para la población de estudio las características en genética forense que los Indels deben cumplir y se van a evaluar son las siguientes: deben ser bialélicos, su tipo de mutación debe ser neutral por razones bioéticas, deben poseer baja tasa de mutación y el tamaño de sus amplicones preferiblemente cortos. Aunque los Indels presentan un grado de desventaja respecto a los STRs en cuanto al polimorfismo y a la necesidad de requerir alrededor de 30 para alcanzar un poder de discriminación semejante a 13 STRs, su ventaja es poseer baja tasa de mutación por generación Ellegren *et al.* 2004 (Indels 2×10^{-9} , STR entre 10^{-2} y 10^{-5}) por lo que resultaría muy conveniente su uso en términos específicos de herencia y con relevancia en casos Forenses como lo afirma Vieira *et al.* (2013).

En diferentes escenarios de la criminalística en los cuales es posible recuperar evidencia traza o en los casos de víctimas de desaparición, donde lo único que se encuentra son restos óseos sin tejido blando, pueden resultar perfiles genéticos parciales para los marcadores principalmente empleados en esta área: los STRs, pues, sus amplicones son de 100 a 500 pb, lo que para el ADN degradado es desfavorable ya que por lo general se requiere que el tamaño de los amplicones no supere las 200 pb y como consecuencia se obtienen resultados inconclusos o negativos.

Por tanto el empleo de los Indels en genética forense complementa favorablemente los análisis para dar solución a casos que anteriormente no se podían resolver con los STRs, en este estudio el uso del kit Investigator DIPplex® kit (Qiagen, Hilden, Germany) presenta un complemento útil que ayuda a esta problemática.

Para obtener resultados y perfiles genéticos óptimos y completos, la concentración de ADN requerida es baja, con tan solo 0,062 ng/μL es posible conseguir perfiles completos (Figura 1-1 y Figura 1-2), por lo tanto los resultados son eficientes con pocas cantidades de ADN favoreciendo la solución de casos forenses y los análisis de criminalística e identificación de desaparecidos a través de Restos óseos esqueletizados sin tejido blando.

Figura 1-1 Electroferograma de Indels del kit DIPplex® con la línea celular 9947A en una concentración de 0.062 ng/μL de ADN, tomado de Wei, et al. (2014).

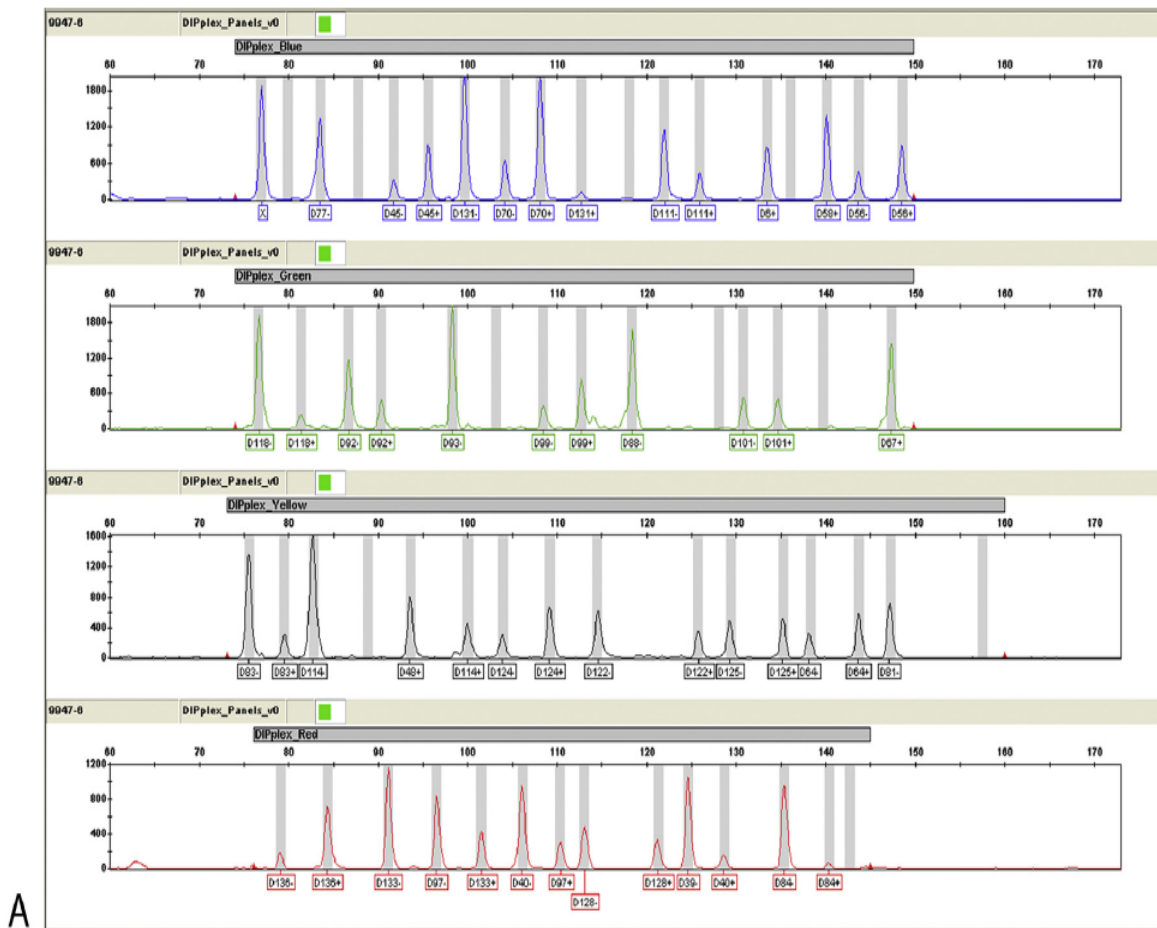
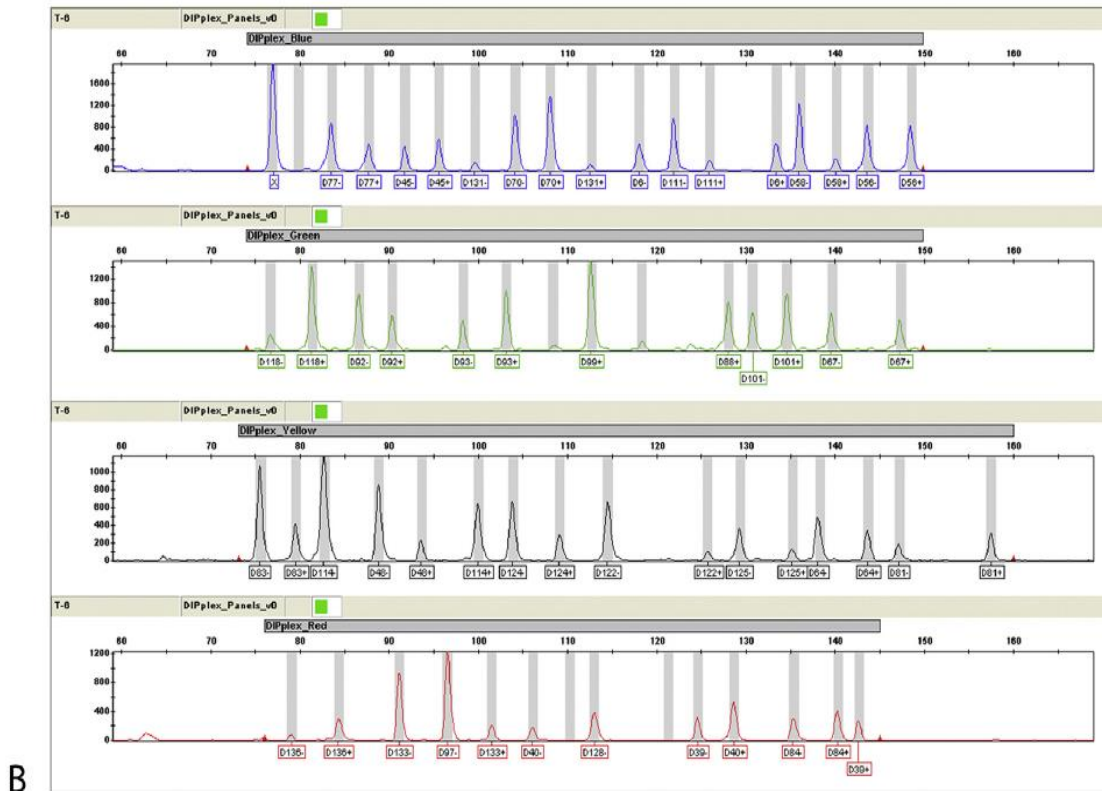


Figura 1-2 Perfiles completos obtenidos con la línea celular T150 (B) en una concentración de 0.062 ng/μL de ADN. tomado de Wei, *et al.* (2014).



1.1 Aporte de los Indels a la Genética Forense

Para el campo de las ciencias forenses los marcadores moleculares Indels son útiles y eficaces pues permiten ser analizados a partir de muestras con cantidades muy pequeñas de ADN e incluso cuando este ADN se encuentra en un avanzado estado de degradación además es posible realizar el análisis simultáneo de distintos Indels mediante el procedimiento conocido como multiplex-PCR. Por lo tanto, estos marcadores moleculares en la rama forense, resultan ser muy útiles para complementar los estudios con STRs (Figura 1-3) pues poseen una limitada practicidad en muestras con ADN degradado, ya que la medida de sus amplicones alcanza los 500 pares de base donde se obtienen resultados pobres para muestras forenses escasas como lo describe Manta *et al.* (2012).

Figura 1-3 Comparación de la secuencias de STR, SNP e INDELS. Gusmaño L. *et al.*, (2012)

- **STR (Short Tandem Repeat)**

CTAGTCGT(GATA)(GATA)(GATA)GCGATCGT

- **Single nucleotide polymorphisms (SNPs)**

GCTAGTCGATGCTC(G/A)GCGTATGCTGTAGC

- **Insertions-deletions (InDels)**

GCTAGTCGATGCTC·GCGTATGCTGTAGC
GCTAGTCGATGCTC(N_x)GCGTATGCTGTAGC

La variación en la secuencia genética en poblaciones humanas permite llegar a la diferenciación entre individuos de una población así como entre poblaciones, si se extiende el análisis es posible encontrar resultados de interés en temas relacionados con fuerzas de migración, deriva génica y selección natural en la diversidad alélica de dicha población, es así como se han desarrollado estudios poblacionales y de distribución de frecuencias alélicas referentes a los marcadores Short Tandem Repeat (STR) autosómicos, del cromosoma “Y” también del cromosoma “X” durante los últimos 10 años, (Paredes *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2005; Olarte *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2009; L Alonso, 2013; Bailliet *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008), este aporte pone al descubierto interrogantes con respecto al empleo de nuevos marcadores que se pueden implementar y que resultan útiles para el desarrollo de estudios tanto poblacionales como de identificación de personas en genética forense, dando paso al uso de los Indels, ya que juegan un papel importante en estos temas, al ser un excelente complemento al alternar su uso con otros marcadores genéticos de uso rutinario en forense.

Con el avance de la tecnología molecular desencadenada a partir del proyecto Genoma Humano y el Proyecto Internacional HapMap como lo describe Musgrave, *et al.* (2007) ha surgido en los últimos años gran expectativa con respecto al uso potencial de SNPs y de Indels en diferentes campos de la genética, ello no implica el remplazo de los microsatélites (STR) pues, estos marcadores siguen siendo la base de estudio y análisis poblacional y forense.

Recientemente se han publicado estudios, en los que se caracterizan genéticamente diferentes poblaciones con el uso de Indels y donde se hace un importante énfasis en la metodología y protocolos técnicos, mostrando las ventajas de usar estas nuevas metodologías, así mismo se llega a la conclusión que los Indels no reemplazan a los microsatelites STRs, por lo tanto, su empleo debe ir conjuntamente desarrollado con STRs, (Builes *et al.*, 2013; Cai-Xia Li *et al.*, 2014; Ferdous *et al.*, 2013; Musgrave, *et al.* 2007).

1.1.1 Marcadores STR rutinarios en genética Forense

Los STR también conocidos como microsatélites son repeticiones en tándem de una unidad pequeña de dos a seis pares de nucleótidos que corresponden aproximadamente al 20% del genoma humano. Son sistemas de herencia codominante que han mostrado ser altamente polimórficos, algunos autores han publicado que los STRs se encuentran inmersos en exones y se hayan asociados con la expresión de algunas enfermedades Goldstein, (1999).

En el estudio de marcadores de tipo autosómico se busca indagar sobre la variación de la recombinación en la herencia biparental de diferentes loci, dado que esto permite plantear hipótesis de la historia de las poblaciones, así como analizar fenómenos de estructura y subestructura poblacional.

Para inferir si hay o no diferencia en la composición genética de la población de la región del Pacífico con respecto a otras poblaciones, la literatura propone que el estudio de los Indels (Inserción/Delección) es apropiado pues se espera que la variación genética sea mínima a lo largo de la historia, a diferencia de lo que sucede con los STRs pues son marcadores moleculares altamente polimórficos, lo cual lleva a los investigadores a observar una gran variabilidad.

Dado que los Indels no son tan polimórficos y por lo tanto, de forma individual son menos informativos que los STRs se prevé la importancia de analizar una batería amplia de Indels que logren alcanzar un Poder de Discriminación (PD) significativo y relativo a los STR cuando el objetivo es dar respuesta a temas referentes a casos de identificación de personas desaparecidas y filiación biológica.

1.2 Ventajas de los marcadores Indels de uso Forense

En los últimos años ha incrementado el interés en el estudio de los Indels en forense, pues estos marcadores han mostrado complementar a los microsatélites por su ventaja al amplificar material genético cuya calidad e integridad se puede encontrar comprometida, se validan y estandarizan en el laboratorio fácilmente, a un bajo costo económico y además, por ser autosómicos, el análisis de los resultados en filiación biológica e identificación de personas desaparecidas o resolución de casos forenses aportan información al LR (likehodd Ratio) ya que el tipo de herencia genética, se evidencia en el alelo proveniente de cada uno de los progenitores que se combina en el nuevo individuo, teniendo este el 50% de la información genética de cada de sus progenitores.

El tipo de polimorfismo Delección/Inserción de los Indels son la base molecular de esta valiosa herramienta biológica, se hallan de forma frecuente y abundante en el genoma humano y por tanto, resultan ser informativos genéticamente, además de encontrarse en los cromosomas autosómicos los cuales recombinan y como consecuencia se convierten en la base de la individualidad, además, su simplicidad técnica hace que se puedan analizar varios Indels simultáneamente a partir de escasas cantidades de ADN, favoreciendo la practicidad en el laboratorio y poca inversión a nivel económico, sus ventajas radican en la facilidad de validación con tecnología de alto rendimiento.

Los Indels con aplicabilidad forense se deben hallar en regiones no codificantes del genoma por ende son una herramienta válida para caracterizar tanto el tipo como la frecuencia de alelos presentes, en la población del Pacífico colombiano Ruiz (1999); Rondón *et al.*(2008); Hincapié *et al.* (2009). La falta de funcionalidad del ADN no codificante, lo convierte a propósito como objeto de estudio en la genética forense ya que es la característica que le permite individualizar sobre todo cuando se trata de identificación de personas o filiación biológica, ahí radica la importancia de el uso de Indels de regiones no codificantes.

El ADN no codificante, está formado por secuencias no conservadoras con diferencias de individuo a individuo y de generación a generación, que permiten evidenciar la posibilidad de no encontrar dos personas que tengan las mismas secuencias (a excepción de los gemelos idénticos que fueron formados en un único saco vitelino).

En el caso de la genética forense se busca que los marcadores genéticos a lo largo del genoma cumplan con una serie de criterios para poder ser utilizados en casos forenses, tales características son:

- Que no haya desequilibrio de ligamiento entre marcadores genéticos.
- Que correspondan a lugares del genoma que no codifiquen para ninguna proteína funcional (esto por evitar problemas de tipo ético).
- Que no tengan un tamaño de amplicón grande.
- Que sean de fácil estandarización y validación en el laboratorio.
- Que las frecuencias alélicas sean obtenidas a partir de individuos no relacionados entre si.
- Que posean una baja tasa de mutación.
- Que se puedan obtener con poco presupuesto económico o a un bajo costo.

Los Indels incluidos en el kit comercial DIPplex® cumplen estas características y resultan de optimo rendimiento para el desarrollo del presente estudio.

2.Desarrollo de la técnica científica para el estudio de Indels en la población de la Región del Pacífico colombiano

La genética forense ha avanzado notoriamente en los últimos años, gracias al aporte de conocimientos en biología molecular que han permitido construir software de alta velocidad y capacidad. La muy conocida y denominada en el argot popular "prueba de ADN" que tuvo sus inicios en la década de los 80 y a raíz del descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN o regiones de ADN no codificantes, ha venido a dar un notable impulso a la genética forense actual como lo muestra Vallone *et al* (2011).

Habitualmente se observa como la genética hace parte de la cotidianidad, pues, con ella es posible confirmar relaciones de parentesco, conocer la predisposición a desarrollar enfermedades, y comprender con mayor profundidad el funcionamiento de nuestro organismo, es así, que desde sus inicios, la genética ha sido una excelente herramienta en el desarrollo de otras ciencias como la antropología y la arqueología y el campo judicial, donde en variadas ocasiones las pruebas de ADN prácticamente han resuelto casos del campo de la criminalística.

Para los estudios de tipo forenses en general, se obtienen muestras biológicas individuales con única procedencia halladas en cantidades mínimas, además el ADN depositado allí también puede estar en poca cantidad o en estado degradado, razón por la cual, el kit de marcadores genéticos Indels DIPplex® es una de las técnicas aceptadas en el campo forense para tipificar varios Indels de interés en una reacción multiplex, los equipos necesarios para desarrollar el método y el análisis, son rutinariamente empleados en cualquier laboratorio de genética forense.

Entonces, resulta óptimo poder implementar el estudio de Indels ya que esta metodología se ha validado y ha demostrado ser muy sensible como lo muestra Doménico, *et al* (2011); Ludes, *et al* (2011); Alonso *et al* (2013); Chung *et al* (2014); Morling *et al* (2012); Korabecna *et al* (2013); Sajantila *et al* (2011); Gusmao *et al* (2011); Pereira *et al* (2009); al permitir analizar tanto muestras con material biológico y por tanto ADN en buen estado, como aquellas que poseen evidente degradación, aportando con los análisis genéticos datos poblacionales que puedan mostrar diferenciación genética entre poblaciones a escala local o incluso mundial, y con ello orientar la posible identidad para casos de personas desaparecidas, casos de filiación biológica y procesos de delincuencia y criminalística en general.

2.1 **Proceso histórico y de Mestizaje En La Región Pacífica**

El poblamiento en la región del Pacífico colombiano se cree que aparentemente se dio en forma heterogénea, pues hacia el siglo XVIII donde el litoral pacífico formaba parte de la provincia de Popayán, habían marcadas divisiones entre lo que hasta hoy se conoce como Chocó y el sur correspondiente a Buenaventura hasta llegar incluso a límites con Ecuador, división que se mantuvo hasta la época de la independencia en 1821, allí a esta región se le conocía con diferentes denominaciones como provincia o cantón.

Hacia el siglo XIX la actividad minera impulsó el poblamiento de mestizos, debido a que los esclavos “negros” mineros que se extendían por las orillas de los ríos Cauca y Magdalena donde se realizaba la extracción y lavado de los minerales recuperados empiezan a expandirse por el territorio, así mismo, los indígenas iniciaron un proceso de mezcla debido a los desplazamientos con fines de la producción agrícola y el cultivo de caña de azúcar y tabaco. Escobar (1997).

Con la explotación de las inmensas riquezas mineras del Chocó, debido a las difíciles condiciones climáticas, los colonizadores se vieron obligados a utilizar esclavos negros africanos, que desplazaron a los indígenas que habitaban la región por lo tanto la población afrodescendiente ocupó y pobló el territorio. La explotación minera ha sido el móvil más fuerte a través de los años en la colonización de estas tierras.

Mas adelante por el decreto 1347 de 1906, se separó la provincia del Chocó, del Cauca y se instituyó como intendencia nacional integrada por las provincias de San Juan y del Atrato finalmente por la Ley 13 de 1947 fue creado el departamento del Chocó, Friedemann (1984).

Es quizás por ello que en la geografía actual colombiana de las poblaciones afrodescendientes más recientes se distinguen las regiones tradicionales de poblamiento hacia la costa norte a lo largo del río Cauca y Magdalena y en la franja del litoral pacífico.

En estas dos regiones se alcanza una población de afrodescendientes con una frecuencia del 50% y para el Pacífico se menciona un 90% del total de su población, en los movimientos poblacionales más recientes al siglo XX en las urbes capitales como Medellín y Bogotá se encontró un 18% y 8% respectivamente de población afrodescendiente de acuerdo a la Encuesta Nacional de Hogares (ENH) realizada por el DANE 2005 en 14 metrópolis regionales, en dicha encuesta no se usa el vocabulario como negro, mulato, mestizo o blanco por el contrario es basada en fotografías enumeradas del 1 al 4 donde aparecían un hombre y 3 mujeres con diferentes fenotipos y la pregunta hacía referencia a con cuál de las imágenes se identificaba. (DANE 2005).

Fue hasta 1904 que se establecieron los 4 departamentos en el Pacífico: de norte a sur (Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño) siendo esta la región con menos número de departamentos en el país. Estos departamentos guardan una característica en común y es la de poseer una parte del litoral Andino en la que se ubican las capitales Quibdó, Cali, Popayán y Pasto, por tanto, el poder político y económico siempre permanecieron en manos de las poblaciones Andinas y las sucesivas reformas territoriales y de administración así como la corta existencia de las “provincias del litoral” (1852-1860) o de lo que se conocía como “Departamento de Tumaco” hacia el siglo XIX, evidencia las dificultades para administrar las extensas selvas no pobladas y de difícil acceso lo que trajo como consecuencia que no se diera la colonización de españoles, por el contrario, se presentó el poblamiento por esclavos que huyeron y se asentaron en esta región. Romero, (1995).

Por su parte, Aprile-Gnisset (1993) planteó un modelo con el fin de explicar el tema del poblamiento del Pacífico colombiano, articulando elementos de análisis que permiten equilibrar las dinámicas generales con las variaciones y contrastes regionales, zonales y locales, en su investigación encontró que en el proceso de poblamiento de la vertiente del Pacífico colombiano se presentaron dos ciclos históricos. El primero muestra sus raíces en el pasado prehispánico o amerindio y su declinación se produce por la conquista española de esos territorios. El segundo ciclo, calificado como afroamericano (por la presencia del color de piel negro procedente de África pero que no implica el concepto de afrogenético), está ligado al ingreso hispánico por ese territorio, que inicia en el siglo XVII, pero que con el marcado cambio económico, adquiere su máxima expresión demográfica y territorial a finales del Siglo XIX.

Para la zona norte de la región Pacífica, la mayoría población negra y los datos de los otros grupos étnicos, confirman varias tendencias socio-demográficas: la sustitución de la población indígena por la negra a finales del siglo XVIII, proceso que venía desde comienzos del siglo XVII; no obstante, los indígenas habían logrado detener su extinción y estabilizaron sus poblaciones. La población negra e indígena sumados representan el 95% del total de la población del norte de la región, la condición minera y esclavista se concentraba en los reales de minas localizados en las cabeceras de los ríos, en el piedemonte de la cordillera Occidental; no obstante el rígido sistema social de castas imperante y el predominio de la minería esclavista presentaba fisuras que permitían la movilidad social hacia la libertad y que los libres habían dado origen a una sociedad paralela a la esclavista. Mientras que los indios se repartían entre varios ríos de la llanura, otros pobladores conformados por una minoría blanca al parecer más preocupada por beneficiarse del oro que por poblar y colonizar, por otra parte confirmado por la débil presencia eclesiástica, militar y burocrática para un territorio extenso e inhóspito.

La región del Pacífico cuenta con aproximadamente 130.000 kilómetros cuadrados, divididos en una extensión por departamento de 46.530 kilómetros cuadrados del Chocó, 29.308 kilómetros cuadrados del Cauca, 22.195 kilómetros cuadrados del Valle del Cauca y 32.820 kilómetros cuadrados de Nariño. La población total en dicha región es de 7.121.267 habitantes, con 1.182.022 para Cauca, 1.498.234 para Nariño, 388.476 para Chocó y 4.052.535 para Valle del Cauca, Oslender (2008).

Entre 1843 y 1870 en la región Pacífica se mantuvieron tasas de crecimiento de población similares al resto del país, la población general del Pacífico sur en 1870 era de 37.900 habitantes y en 1905 pasó a 64.769 habitantes, precisamente, se produjo la configuración de un nuevo patrón de poblamiento en el que se combinan los asentamientos ribereños con los grandes puertos fluvio-marinos, haciéndose ambos complementarios. En efecto, en la segunda mitad del siglo XIX Buenaventura se consolida como el nuevo epicentro del Pacífico sur, ya que en el período intercensal de 1870-1905 su población pasó de 3.991 habitantes a 12.195, con una tasa de crecimiento de 25%.

Tumaco tuvo un desarrollo paralelo al pasar de 2.642 habitantes en 1870 a 11.145 en 1905, con una tasa de crecimiento de 30.5%. Guapi también tuvo un crecimiento poblacional interesante, porque en 1870 su población era de 4.933 y en 1905 alcanzó los 8.211 habitantes, con una tasa de crecimiento del 12%. El caso de Timbiquí es muy notorio, porque la explotación minera moderna produjo cambios muy drásticos en los asentamientos tradicionales, en 1870 su población era de 3.577 y para 1905 alcanzó los 10.941 habitantes, con una tasa de crecimiento de 25%. En adelante, la suerte de las poblaciones ribereñas quedaría atada a la suerte de las grandes concentraciones portuarias y a los proyectos de modernización que las tomaron como los lugares fundamentales para inducir los cambios que querían en la región, de acuerdo con expectativas económicas y políticas nacionales e internacionales. (García 2009).

Teniendo un acercamiento a los estudios genéticos recientes en muestras de la población de Buenaventura, Mulaló y Tumaco, de la región pacífica en el suroccidente colombiano, investigadores analizaron ocho STR's autosómicos en 78 individuos no relacionados, y al compararlos con las poblaciones amerindias Awa-Kuaikier y Coyaima, y las mestizas del Valle del Cauca y de Cauca, encontraron que las muestras afrodescendientes y amerindias fueron moderadamente diversas (h entre $0,768 \pm 0,414$ y $0,796 \pm 0,424$), mientras que las mestizas mostraron índices mayores ($>0,803$), lo que puede ser consecuencia del mestizaje con amerindios, el cual puede explicar la alta endogamia observada para éstas. Los valores F_{ST} mostraron estructura moderada entre las poblaciones afrodescendientes ($F_{ST} = 0,098$; $p < 0,05$), soportado por la tasa de migración encontrada y alta entre los tres grupos étnicos comparados ($F_{ST} = 0,26723$; $p < 0,05$). (34,298). Guauque *et al* (2010).

Otros estudios han mostrado la existencia de relaciones genéticas entre las poblaciones del sur-occidente y las de la región andina colombiana, al analizar las frecuencias alélicas de 12 microsatélites autosómicos y el tipo y frecuencia de RFLP's de mtDNA presentes en 472 individuos de tres grupos étnicos: mestizos, indígenas y afroamericanos, al observar los haplotipos de mtDNA en individuos afrodescendientes el 15% eran marcadores típicos amerindios y el 43% de africanos. El AMOVA, mostró que la estructura genética no es significativa (F_{ST} de 0.032); adicionalmente se evidenció alta endogamia en la muestra mestiza de Caldas (0.43) y en la muestra indígena Coyaima (0.34) Rondon *et al* (2008).

Otros estudios realizados con marcadores Indels AIM o marcadores de ancestría para evaluar las proporciones de mezcla de diferentes grupos étnicos, incluyendo la estratificación en los estudios de asociación genética, allí determinaron las proporciones de mezcla Africana, Europea y Nativo Americana utilizando 46 marcadores genéticos en una población de 500 individuos del Departamento del Cauca. Los resultados que encontraron fueron una base genética muy diversa, por ejemplo la ancestría promedio en la población del Cauca fue del 48 % de Nativos Americanos, el 39 % Europeos y el 14 % de Africanos, dejando como precedente una compleja estratificación poblacional del Departamento del Cauca, resultado de la mezcla genética de tres poblaciones continentales. (Torres *et al*, 2016).

Los estudios genéticos mencionados anteriormente realizados en población humana de la región Pacífica colombiana, evidencian la necesidad de análisis genético-poblacional,

pues, son escasas las publicaciones con marcadores genéticos autosómicos Indels de aplicación forense con el kit DIPplex® para esta región de Colombia.

2.2 Metodología del Trabajo de Investigación

La metodología utilizada consistió de un procedimiento ordenado que involucró el desarrollo de la unidad teórica basada en investigaciones y reportes técnico-científicos que permitieron servir de apoyo para el componente experimental. Todos los procedimientos prácticos y analíticos fueron realizados en el laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General de la Nación con sede en Bogotá, el cual se encuentra acreditado con la norma ISO/IEC 17025:2005, cabe anotar que el desarrollo de la presente tesis cumplió con el aval del Jefe de Departamento de Criminalística del CTI, del Jefe de Sección de Laboratorios Nivel Central del CTI y de la Directora Técnica del Grupo Genética Departamento de Criminalística Nivel Central.

2.1.1 Selección de muestras biológicas y criterios de inclusión

Se seleccionaron y analizaron muestras de sangre de individuos (Hombres y Mujeres) no relacionados biológicamente, al azar, pertenecientes a la región del Pacífico colombiano, recolectadas en los departamentos de Nariño (64 Individuos), Cauca (50 Individuos), Chocó (56 Individuos) y valle del Cauca (31 Individuos) para un total de 201 muestras, estas muestras de sangre se encuentran bajo custodia del Grupo de Genética del Departamento de Criminalística Nacional del CTI (Cuerpo Técnico de Investigación) en la Fiscalía General de la Nación y corresponden a las muestras biológicas del banco de muestras de funcionarios de la misma, los criterios de inclusión fueron:

- Mayores de edad.
- Residentes en los cuatro departamentos antes mencionados.
- Tiempo mínimo de residencia de 5 años.
- Aprobación del consentimiento informado para estudios poblacionales donde se garantiza la confidencialidad de los datos suministrados (Ver anexo 1).

2.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el DNA IQ™ Casework Kit para el equipo automático Maxwell® (Promega), el cual usa la resina DNA IQ™ para purificar el ADN. El procedimiento se realizó de forma manual a través de los reactivos de purificación y buffer en tubos ependorf de 1.5 mL, combinando la resina paramagnética con los reactivos de lisis y lavado durante todo el procedimiento de acuerdo a lo descrito por Bjerke *et al.* (2006).

2.1.2 PCR-RealTime para la Cuantificación de ADN

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar y se usa para la cuantificación de ADN de una muestra. Utilizando primers específicos de secuencia y sondas TaqMan, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN, monitoreando el progreso de la amplificación mientras esta se lleva a cabo (Swango, *et al.*,... 2006). Para ello se utilizó el Kit de cuantificación Quantifiler® Human DNA (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante y con el uso del equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, así se determinó la cantidad total de ADN humano posible de amplificar con PCR multiplex convencional en unidades (ng/μL) y así mismo estimar la presencia de inhibidores de la polimerasa.

2.1.3 Tipificación y Análisis de Indels

El ADN extraído se amplificó por medio de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), de Indels autosómicos de región no codificante del genoma, con una reacción de PCR

multiplex con el Kit comercial Investigator DIPplex® de la casa comercial (Qiagen) destinado para aplicaciones de biología molecular forense e identificación humana. Este Kit permite la amplificación de 30 Indels (HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD58, HLD56, HLD118, HLD92, HLD93, HLD99, HLD88, HLD101, HLD67, HLD83, HLD114, HLD48, HLD124, HLD122, HLD125, HLD64, HLD81, HLD136, HLD133, HLD97, HLD128, HLD39, HLD40, HLD84) distribuidos en 19 cromosomas autosómicos donde la abreviatura HDL del inglés Human Locus DIP (Deletion-Insertion-Polimorfism) además de incluir los dos Indels del locus de la amelogenina.

En la Tabla **2-1** se muestra nombre del locus DIP (Polimorfismo de Inserción/Delección Indel), su localización en el Cromosoma, el código de acceso al GenBank y/o SNP ID, su secuencia Motif o amplicon blanco y la Referencia Alélica. Todo el proceso de laboratorio se realizó de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante y con los parámetros según Neuvonen. (2012), Turrina et al. (2011), Zidkova et al. (2013) y LaRue B. (2012).

Las condiciones de PCR se realizaron según el protocolo recomendado por el fabricante del Kit DIPplex® de (Qiagen) en un termociclador para PCR el System 9700 (Applied Biosystems, USA) con un volumen de reacción final ajustado y modificado a 12.5 µl el cual contiene: 6.7 µl de agua libre de nucleasa, 2.5 µl de Mezcla de reacción A que contiene dNTP mix, MgCl₂, y suero de albumina bovina (BSA), 2.5 µl de mezcla de Primer, 0.3 µl de Multi Taq2 polimerasa y 100pg de ADN tal y como se muestra en la Tabla **2-2**. El control de ADN positivo fue la línea celular 9947A, la amplificación se realizó con 30 ciclos, las temperaturas y tiempos se muestran en la Tabla 2-3.

Tabla 2-1

Información Locus-especifica del Kit Investigator DIPplex®

Locus DIP	Localización n Cromosoma	Acceso al GenBank/ SNP ID	Secuencia Motif	Referencia Alélica
Amelogenina X	Xp22.1-22.3		M55418	X

ESTUDIO DE INDELS AUTOSÓMICOS DE USO FORENSE EN UNA
POBLACIÓN DE LA REGIÓN DEL PACÍFICO COLOMBIANO

Amelogenina Y	Yp11.2		M55419	Y
HLD77	7q31.1	rs1611048	TAAG	+DIP
HLD45	2q31.1	rs2307959	CACG	-DIP
HLD131	7q36.2	rs1611001	TGGGCTTATT	+DIP
HLD70	6q16.1	rs2307652	AGCA	-DIP
HLD6	16q13	rs1610905	GCAGGACTGGGCACC	-DIP
HLD111	17p11.2	rs1305047	CACA	-DIP
HLD58	5q14.1	rs1610937	AGGA	+DIP
HLD56	4q25	rs2308292	TAAGT	+DIP
HLD118	20p11.1	rs16438	CCCCA	-DIP
HLD92	11q22.2	rs201771066	GTTT	-DIP
HLD93	12q22	rs150042219	ACTTT	-DIP
HLD99	14q23.1	rs2308163	TGAT	-DIP
HLD88	9q22.32	rs8190570	CCACAAAGA	+DIP
HLD101	15q26.1	rs2307433	GTAG	-DIP
HLD67	5q33.2	rs1305056	CTACTGAC	-DIP
HLD83	8p22	rs2308072	AAGG	-DIP
HLD114	17p13.3	rs2307581	TCCTATTCTACT CTGAAT	-DIP
HLD48	2q11.2	rs28369942	GACTT	-DIP
HLD124	22q12.3	rs6481	GTGGA	-DIP
HLD122	21q22.11	rs8178524	GAAGTCTGAGG	-DIP
HLD125	22q11.23	rs16388	ATTGCC	-DIP
HLD64	5q12.3	rs397832668	GACAAA	+DIP
HLD81	7q21.3	rs17879936	GTAAGCATTGT	-DIP
HLD136	22q13.1	rs16363	TGTTT	-DIP
HLD133	3p22.1	rs2067235	CAACCTGGATT	
HLD97	13q12.3	rs17238892	AGAGAAAGCTG AAG	-DIP
HLD40	1p32.3	rs146044344	GGGACAGGTGG CCACTAGGAGA	+DIP
HLD128	1q31.3	rs2307924	ATTAAATA	-DIP
HLD39	1p22.1	rs17878444	CCTAAACAAAAA TGGGAT	-DIP
HLD84	8q24.12	rs3081400	CTTTC	-DIP

HLD: Human Locus DIP (Polimorfismo de Inserción/Delección); -DIP: Delección; +DIP: Inserción

Tabla 2-2

Información Componentes de la PCR Kit Investigator DIPplex® y modificación

Componentes de la PCR Kit DIPplex®	Volumen por reacción recomendado casa comercial	Modificación para el presente estudio
Reaction Mix A	5.0 µl	2.5 µl
Primer Mix	5.0 µl	2.5 µl
Multi Taq2 DNA Polimerasa	0.6 µl	0.3 µl
Agua libre de Nucleasas	Variable	6.7 µl
Templete de ADN	Variable	100pg
Total volumen	25 µl	12.5 µl

Tabla 2-3

Protocolo de termociclaje estandar recomendado para todas las muestras de ADN Kit Investigator DIPplex® PCR

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94°C*	4 min	1 ciclo
94°C	30 s	
61°C	120 s	30 ciclos
72°C	75 s	
68°C	60 min	1 ciclo
10°C	∞	1 ciclo

Acto seguido a la amplificación los productos de PCR fueron preparados para la electroforesis capilar mediante la adición de 1 ul de amplificado y 12 ul de Hi-Di formamida (AB) previamente mezclada con el size estándar (BTO 550).

El equipo de separación de fragmentos y genotipificación de Indels que se empleó fue un analizador genético de electroforesis capilar ABI 3130XL el cual se encuentra en las instalaciones del Grupo de Genética del Cuerpo Técnico de Investigación de la Fiscalía General de la Nación con sede Bogotá, en este analizador genético se utilizó una matriz capilar de 36 cm y el Polímero POP-4 para corrido, el Size standard es el BTO 550 (Qiagen) el cual talla fragmentos de tamaño que van desde las 60 a las 550pb, antes del corrido electroforético se instaló una matriz de cinco colores llamada BT5 para la detección de los 5 fluorocromos: 6-FAM, BTG, BTY, BTR y BTO bajo el método de filtro virtual Any5Dye, los colores detectados se muestran en la Tabla 2-4, las muestras fueron inyectadas durante 10 segundos a 3 kV y se sometieron a electroforesis durante 1000 segundos a 15 kV y a una temperatura de 60 C°.

Tabla 2-4

Colores y fluorocromos de la matriz estándar BT5

Color	Fluorocromos matriz Estandar BT5
Azul (B)	6-FAM
Verde (G)	BTG
Amarillo (Y)	BTY
Rojo (R)	BTR
Naranja (O)	BTO

Para la identificación de los polimorfismos se utilizó el software GeneMapper® ID-X (Applied Biosystems, Foster City, California) donde se realizó la asignación alélica correspondiente.

En el análisis estadístico como la estimación de frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg se empleó el software GENEPOP V 3.4 del cual se tiene acceso en la página web <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/index.html> este software desarrollado por Raymond y Rousset (Raymond 1995) permite realizar el computo del test exacto de equilibrio Hardy-Weinberg, calcular estimadores como FST, frecuencias de alelos nulos entre otros.

Para los estimadores forenses: Probabilidad de Coincidencia (PC) y Poder de Discriminación (PD), el contenido de información polimórfica (CIP), y los índices de paternidad: Índice Típico de Paternidad (ITP) y poder de exclusión (PE) fueron calculados con el software PowerStats V.1.2 de acuerdo a Tereba, (2000) el cual usa como base Excel como lo describe Butler, (2005) el programa se encuentra disponible en la página web: <http://www.promega.com/geneticidtools/default.htm> .

Para el análisis de Estructura en la población se utilizó el software STRUCTURE v2.3.4, que permite determinar el número más probable de clusters (K) presentes por medio de análisis bayesiano de acuerdo a la descripción de Pritchard et al. (2000), se encuentra disponible en la página web <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>.

3.Resultados de las frecuencias alélicas para los Indels en los cuatro departamentos

En Colombia dos de las regiones geográficas como son el sur-occidente y el centro del país, se ha observado una aparente variación en sus componentes genéticos poblacionales, los estudios describen que esta población se caracteriza por procesos de mezcla y migración Rondón et al. (2008); Porras et al. (2009), Olarte et al. (2010) además de presentar mayores consecuencias socioculturales generadas durante la época de colonización española Zapata (1997).

En la muestra se analizaron 201 individuos no relacionados biológicamente residentes de los cuatro departamentos de la región Pacífica colombiana como son: Chocó, Cauca, Nariño y Valle del Cauca como se ilustra en la Figura 3-1, de todas ellas se obtuvo perfil genético completo para los 30 Indels del kit DIPplex®. Inicialmente se modificó el volumen final de PCR en el Kit DIPplex® a la mitad (12.5ul) al tratar con muestras de sangre total, obteniéndose resultados óptimos al reproducir el perfil completo para las 201 muestras biológicas de cada individuo, lo cual concuerda con lo publicado por Morling y colaboradores (Morling et al, 2012).

El análisis se inició estimando las frecuencias alélicas para los 30 Indels incluidos en el kit DIPplex® en los cuatro grupos de departamentos incluidos en el estudio Nariño (64 Individuos), Cauca (50 Individuos), Chocó (56 Individuos) y Valle del Cauca (31 Individuos), (Tabla 3-1, Tabla 3-2, Tabla 3-3 y Tabla 3-4), a partir de esta estimación se analizaron los demás parámetros como la Heterocigosidad Observada (H_o) con rangos de 0.1724 – 0.5172 para el Chocó, 0.1875 - 0.5781 para Nariño, 0.1951 - 0.5853 para el Cauca 0.2432 - 0.6486 para el Valle del Cauca, y la Heterocigosidad Esperada (H_e), con rangos de 0.2142 – 0.3126 para el Chocó, 0,3205-0.3224 para Nariño, 0.1303 - 0.2074 para el Cauca y 0.1738 - 0.1875 para el Valle del Cauca.

Figura 3-1 Mapa de Colombia mostrando los departamentos de la Región del Pacífico donde se obtuvieron las muestras biológicas.



Tabla 3-1

Frecuencias Alélicas y parámetros forenses para los 30 Indels en los 58 individuos del departamento del Chocó de la región del Pacífico colombiano.

MARCADOR	DIP(-)	DIP (+)	Ho	He	PC	PD	CIP	PE	ITP	EHW
HLD77	0.6465	0.3534	0.3275	0.3126	0.3763	0.6237	0.3526	0.0755	0.7400	0.0421
HLD45	0.5603	0.4396	0.3965	0.2882	0.3466	0.6533	0.3713	0.1118	0.8285	0.1806
HLD131	0.2758	0.7241	0.3103	0.2337	0.4346	0.5653	0.3197	0.0678	0.7250	0.1008
HLD70	0.2413	0.7586	0.2068	0.2142	0.4910	0.5089	0.2991	0.0316	0.6304	0.0017
HLD6	0.500	0.500	0.5172	0.2925	0.384	0.6159	0.3750	0.203	1.0357	1.0000
HLD111	0.5862	0.4137	0.3793	0.2838	0.3513	0.6486	0.3674	0.1018	0.8055	0.1065
HLD58	0.6982	0.3017	0.4310	0.2465	0.4262	0.5737	0.3325	0.1339	0.8787	1.0000
HLD56	0.4122	0.5877	0.3103	0.2838	0.3505	0.6494	0.3671	0.0628	0.7125	0.0068
HLD118	0.6465	0.3534	0.3965	0.2673	0.3822	0.6177	0.3526	0.1118	0.8285	0.3870
HLD92	0.6379	0.3620	0.4482	0.2702	0.3912	0.6087	0.3552	0.1461	0.9062	0.7824
HLD93	0.5086	0.4913	0.3620	0.2924	0.3347	0.6652	0.3749	0.0924	0.7837	0.0376
HLD99	0.5086	0.4913	0.4310	0.2924	0.3478	0.6521	0.3749	0.1339	0.8787	0.3008
HLD88	0.4137	0.5862	0.3448	0.2838	0.3483	0.6516	0.3674	0.0837	0.7631	0.0309
HLD101	0.2413	0.7586	0.2758	0.2142	0.4720	0.5279	0.2991	0.0540	0.6904	0.0712
HLD67	0.4655	0.5344	0.3793	0.2911	0.3388	0.6611	0.3738	0.1018	0.8055	0.0700
HLD83	0.4310	0.5689	0.4482	0.2869	0.3626	0.6373	0.3701	0.1461	0.9062	0.5922
HLD114	0.3362	0.6637	0.2931	0.2611	0.3894	0.6105	0.3467	0.0607	0.7073	0.0162
HLD48	0.2586	0.7413	0.1724	0.2243	0.4887	0.5112	0.3099	0.0227	0.6041	0.0030
HLD124	0.6120	0.3879	0.5344	0.2778	0.4191	0.5808	0.3621	0.2194	1.0740	0.4168
HLD122	0.6637	0.3362	0.3275	0.2611	0.3870	0.6129	0.3467	0.0755	0.7435	0.0437
HLD125	0.6034	0.3965	0.5172	0.2800	0.4054	0.5945	0.3640	0.2030	1.0357	0.7832
HLD64	0.2758	0.7241	0.1724	0.2337	0.4726	0.5273	0.3197	0.0227	0.6041	0.0048
HLD81	0.4310	0.5689	0.3793	0.2869	0.3460	0.6539	0.3701	0.1018	0.8055	0.1068
HLD136	0.2844	0.7155	0.1551	0.2381	0.4738	0.5261	0.3242	0.0187	0.5918	0.0001*
HLD133	0.6206	0.3793	0.4482	0.2754	0.3822	0.6177	0.3600	0.1461	0.9062	0.7809
HLD97	0.5258	0.4741	0.2241	0.2917	0.3525	0.6474	0.3743	0.0366	0.6444	0.0059
HLD40	0.3620	0.6379	0.4137	0.2702	0.3810	0.6189	0.3552	0.1225	0.8529	0.4072
HLD128	0.4741	0.5258	0.3620	0.2917	0.3359	0.6640	0.3743	0.0924	0.7837	0.0378
HLD39	0.5431	0.4568	0.2586	0.2903	0.3454	0.6545	0.3731	0.0478	0.6744	0.0020
HLD84	0.3534	0.6465	0.3275	0.2673	0.4072	0.5927	0.3526	0.0270	0.6170	0.0025

DIP (-), Delección; DIP (+), Inserción; (Ho), Heterocigosidad observada; (He), Heterocigosidad esperada; PC, Probabilidad de Coincidencia; PD, Poder de Discriminación; CIP, Contenido de Información Polimórfica; (PE), Poder de Exclusión; ITP, Índice Típico de Paternidad; (EHW), Equilibrio Hardy-Weinberg. * Valor significativo después de la corrección de Bonferroni ($p < 0.0017$)

Tabla 3-2

Frecuencias Alélicas y parámetros forenses para los 30 Indels en los 64 individuos del departamento de Nariño de la región del Pacífico colombiano.

DIP (-), Deleción; DIP (+), Inserción; (Ho), Heterocigosidad observada; (He), Heterocigosidad esperada; PC,

MARCADOR	DIP(-)	DIP(+)	Ho	He	PC	PD	PIC	PE	ITP	
HLD77	0.5234	0.4765	0.3906	0.3218	0.3393	0.6606	0.3744	0.1083	0.8205	0.0838
HLD45	0.4218	0.5781	0.2812	0.3146	0.3496	0.6503	0.3688	0.0561	0.6956	0.0029
HLD131	0.5546	0.4453	0.3593	0.3186	0.3403	0.6596	0.3719	0.091	0.7804	0.0413
HLD70	0.4062	0.5937	0.2812	0.3111	0.3549	0.6450	0.3660	0.0561	0.6956	0.0099
HLD6	0.4531	0.5468	0.3437	0.3196	0.3378	0.6621	0.3727	0.0831	0.7619	0.0219
HLD111	0.5078	0.4921	0.4843	0.3224	0.3676	0.6323	0.3749	0.1741	0.9696	0.8055
HLD58	0.5703	0.4296	0.4843	0.3161	0.3774	0.6225	0.3700	0.1741	0.9696	1.0000
HLD56	0.3750	0.6250	0.3125	0.3023	0.3652	0.6347	0.3588	0.0688	0.7272	0.0082
HLD118	0.5859	0.4140	0.3906	0.3129	0.3530	0.6469	0.3675	0.1083	0.8205	0.1257
HLD92	0.5078	0.4921	0.4531	0.3224	0.3549	0.6450	0.3749	0.1496	0.9142	0.4597
HLD93	0.3671	0.6328	0.2343	0.2997	0.3833	0.6166	0.3567	0.0398	0.6530	0.0055
HLD99	0.4531	0.5468	0.5625	0.3196	0.4165	0.5834	0.3727	0.2482	1.1428	0.3256
HLD88	0.3437	0.6562	0.1875	0.2910	0.4140	0.5859	0.3493	0.0264	0.6153	0.0001*
HLD101	0.4843	0.5156	0.5000	0.3222	0.3754	0.6245	0.3747	0.1875	0.9999	1.0000
HLD67	0.4921	0.5078	0.2968	0.3224	0.3354	0.6645	0.3749	0.0622	0.7111	0.0035
HLD83	0.6484	0.3515	0.5156	0.2940	0.4272	0.5727	0.3519	0.2015	1.0322	0.4127
HLD114	0.5390	0.4609	0.5781	0.3205	0.4262	0.5737	0.3734	0.2654	1.1851	0.3125
HLD48	0.1718	0.8281	0.2187	0.1836	0.5683	0.4316	0.2441	0.0350	0.6400	0.0734
HLD124	0.4609	0.5390	0.3906	0.3205	0.3413	0.6586	0.3734	0.1083	0.8205	0.0847
HLD122	0.6015	0.3984	0.5781	0.3092	0.4438	0.5561	0.3644	0.2654	1.1851	0.1260
HLD125	0.5703	0.4296	0.6406	0.3161	0.4848	0.5151	0.3700	0.3424	1.3913	0.0218
HLD64	0.2265	0.7734	0.2968	0.2260	0.4848	0.5151	0.2890	0.0622	0.7111	0.2782
HLD81	0.3046	0.6953	0.3906	0.2733	0.4145	0.5854	0.3339	0.1083	0.8205	0.5580
HLD136	0.4453	0.5546	0.5156	0.3186	0.3891	0.6108	0.3719	0.2015	1.0322	0.8045
HLD133	0.6328	0.3671	0.4843	0.2997	0.4028	0.5971	0.3567	0.1741	0.9696	1.0000
HLD97	0.5156	0.4843	0.3750	0.3222	0.3364	0.6635	0.3747	0.0994	0.8000	0.0477
HLD40	0.5468	0.4531	0.5000	0.3196	0.3793	0.6206	0.3727	0.1875	1.0000	1.0000
HLD128	0.4843	0.5156	0.5000	0.3222	0.3754	0.6245	0.3747	0.1875	1.0000	1.0000
HLD39	0.4296	0.5703	0.4531	0.3161	0.3647	0.6352	0.3700	0.1496	0.9142	0.6105
HLD84	0.5078	0.4921	0.3906	0.3224	0.3383	0.6616	0.3749	0.1083	0.8205	0.0835

Probabilidad de Coincidencia; PD, Poder de Discriminación; PIC, Contenido de Información Polimórfica; (PE), Poder de Exclusión; ITP, Índice Típico de Paternidad; (EHW), Equilibrio Hardy-Weinberg. * Valor significativo después de la corrección de Bonferroni ($p < 0.0017$).

Tabla 3-3

Frecuencias Alélicas y parámetros forenses para los 30 Indels en los 50 individuos del departamento del Cauca de la región del Pacífico colombiano

MARCADOR	DIP(-)	DIP(+)	Ho	He	PC	PD	PIC	PE	ITP	EHW
HLD77	0.4756	0.5243	0.2682	0.2070	0.3408	0.6591	0.3744	0.0513	0.6833	0.0042
HLD45	0.4878	0.5121	0.3902	0.2074	0.3384	0.6615	0.3748	0.1080	0.8200	0.2095
HLD131	0.4024	0.5975	0.3170	0.1996	0.3527	0.6472	0.3653	0.0708	0.7321	0.0480
HLD70	0.3536	0.6463	0.3170	0.1897	0.3765	0.6234	0.3526	0.0708	0.7321	0.0826
HLD6	0.4146	0.5853	0.1951	0.2014	0.3765	0.6234	0.3676	0.0284	0.6212	0.0088
HLD111	0.4512	0.5487	0.3170	0.2055	0.3384	0.6615	0.3726	0.0708	0.7321	0.0266
HLD58	0.5121	0.4878	0.2439	0.2074	0.3456	0.6543	0.3748	0.0428	0.6612	0.0020
HLD56	0.3048	0.6951	0.3658	0.1759	0.4110	0.5889	0.3340	0.0944	0.7884	0.4596
HLD118	0.5609	0.4390	0.4878	0.2044	0.3765	0.6234	0.3712	0.1770	0.9761	1.0000
HLD92	0.4634	0.5365	0.3414	0.2064	0.3361	0.6638	0.3736	0.0820	0.7592	0.0582
HLD93	0.4268	0.5731	0.3658	0.2030	0.3456	0.6543	0.3695	0.0944	0.7884	0.1155
HLD99	0.3658	0.6341	0.3902	0.1925	0.3741	0.6258	0.3563	0.1080	0.8200	0.3218
HLD88	0.5365	0.4634	0.9756	0.2064	0.4193	0.5806	0.3736	0.0080	0.5540	0.0079
HLD101	0.4878	0.5121	0.3902	0.2074	0.3384	0.6615	0.3748	0.1080	0.8200	0.2095
HLD67	0.4512	0.5487	0.3170	0.2055	0.3384	0.6615	0.3726	0.0708	0.7321	0.0266
HLD83	0.4756	0.5243	0.6097	0.2070	0.4491	0.5508	0.3744	0.3027	1.2815	0.2183
HLD114	0.4634	0.5365	0.5365	0.2064	0.3979	0.6020	0.3736	0.2215	1.0789	0.7574
HLD48	0.3170	0.6829	0.2439	0.1797	0.4122	0.5877	0.3392	0.0428	0.6612	0.0086
HLD124	0.2926	0.7073	0.4390	0.1718	0.4360	0.5639	0.3283	0.1394	0.8913	1.0000
HLD122	0.4024	0.5975	0.5609	0.1996	0.4301	0.5698	0.36530	0.2466	1.1388	0.3515
HLD125	0.5121	0.4878	0.5853	0.2074	0.4289	0.5710	0.3748	0.2736	1.2058	0.3586
HLD64	0.2682	0.7317	0.3902	0.1629	0.4455	0.5544	0.3155	0.1080	0.8200	1.0000
HLD81	0.1951	0.8048	0.3902	0.1303	0.5240	0.4759	0.2647	0.1080	0.8200	0.3118
HLD136	0.5365	0.4634	0.7317	0.2064	0.5740	0.4259	0.3736	0.4789	1.8636	0.0046
HLD133	0.5243	0.4756	0.3658	0.2070	0.3361	0.6638	0.3744	0.0944	0.7884	0.1157
HLD97	0.4390	0.5609	0.2926	0.2044	0.3432	0.6567	0.3712	0.0605	0.7068	0.0110
HLD40	0.4756	0.5243	0.5609	0.2070	0.4122	0.5877	0.3744	0.2466	1.1388	0.5392
HLD128	0.4756	0.5243	0.4146	0.2070	0.3444	0.6555	0.3744	0.1230	0.8541	0.3469
HLD39	0.3170	0.6829	0.4878	0.1797	0.5217	0.4782	0.3392	0.0021	0.5256	0.0001*
HLD84	0.3048	0.6951	0.3170	0.1759	0.4098	0.5901	0.3340	0.0708	0.7321	0.1370

DIP (-), Deleción; DIP (+), Inserción; (Ho), Heterocigosidad observada; (He), Heterocigosidad esperada; PC, Probabilidad de Coincidencia; PD, Poder de Discriminación; CIP, Contenido de Información Polimórfica; (PE), Poder de Exclusión; ITP, Índice Típico de Paternidad; (EHW), Equilibrio Hardy-Weinberg.* Valor significativo después de la corrección de Bonferroni ($p < 0.0017$).

Tabla 3-4

Frecuencias Alélicas y parámetros forenses para los 30 Indels en los 31 individuos del departamento del Valle del Cauca de la región del Pacífico colombiano.

MARCADOR	DIP (-)	DIP (+)	Ho	He	PC	PD	PIC	PE	ITP	
HLD77	0.4594	0.5405	0.3243	0.1863	0.3367	0.6632	0.3733	0.0740	0.7400	0.0457
HLD45	0.4864	0.5135	0.3243	0.1873	0.3338	0.6661	0.3748	0.074	0.7400	0.0462
HLD131	0.5135	0.4864	0.3783	0.1873	0.3367	0.6632	0.3748	0.1013	0.8043	0.1861
HLD70	0.3108	0.6891	0.4054	0.1606	0.4127	0.5872	0.3366	0.1172	0.8409	0.7119
HLD6	0.4324	0.5675	0.4864	0.1841	0.3776	0.6223	0.3703	0.1759	0.9736	1.0000
HLD111	0.5945	0.4054	0.2702	0.1808	0.35719	0.6428	0.3658	0.0520	0.6851	0.0079
HLD58	0.6351	0.3648	0.4054	0.1738	0.3776	0.6223	0.3560	0.1172	0.8409	0.4835
HLD56	0.3378	0.6621	0.2972	0.1678	0.3878	0.6121	0.3473	0.0624	0.7115	0.0613
HLD118	0.5810	0.4189	0.5135	0.1826	0.3951	0.6048	0.3683	0.1996	1.0277	1.0000
HLD92	0.6756	0.3243	0.4324	0.1643	0.4097	0.5902	0.3422	0.1348	0.8809	1.0000
HLD93	0.4324	0.5675	0.3243	0.1841	0.3425	0.6574	0.3703	0.0740	0.7400	0.0455
HLD99	0.4189	0.5810	0.4324	0.1925	0.3586	0.6413	0.3683	0.0426	0.6607	0.0025
HLD88	0.4459	0.5540	0.4594	0.1853	0.3630	0.6369	0.3720	0.1544	0.9250	0.7411
HLD101	0.3648	0.6351	0.4054	0.1738	0.3776	0.6223	0.3560	0.1172	0.8409	0.4835
HLD67	0.4459	0.5540	0.5135	0.1853	0.3878	0.6121	0.3720	0.1996	1.0277	1.0000
HLD83	0.5405	0.4594	0.4324	0.1863	0.3513	0.6486	0.3733	0.1348	0.8809	0.5088
HLD114	0.5270	0.4729	0.4594	0.1869	0.3586	0.6413	0.3742	0.1544	0.9250	0.7417
HLD48	0.2567	0.7432	0.2432	0.1431	0.4638	0.5361	0.3088	0.0426	0.6607	0.0331
HLD124	0.500	0.500	0.4054	0.1875	0.3411	0.6588	0.3750	0.1172	0.8409	0.3224
HLD122	0.4864	0.5135	0.6486	0.1873	0.4828	0.5171	0.3748	0.3533	1.4230	0.1065
HLD125	0.4729	0.5270	0.6216	0.1869	0.4594	0.5405	0.3742	0.3176	1.3214	0.1953
HLD64	0.2567	0.7432	0.3513	0.1431	0.4521	0.5478	0.3088	0.0869	0.7708	0.6691
HLD81	0.3108	0.6891	0.2972	0.1606	0.4068	0.5931	0.3366	0.0624	0.7115	0.0652
HLD136	0.4594	0.5405	0.4864	0.1863	0.3718	0.6281	0.3733	0.1759	0.9736	1.0000
HLD133	0.6081	0.3918	0.4594	0.1787	0.3805	0.6194	0.3630	0.1544	0.9250	1.0000
HLD97	0.5675	0.4324	0.5405	0.1841	0.4068	0.5931	0.3703	0.2255	1.0882	0.7391
HLD40	0.5000	0.5000	0.4054	0.1875	0.3411	0.6588	0.3750	0.1172	0.8409	0.3224
HLD128	0.5135	0.4864	0.3243	0.1873	0.3338	0.6661	0.3748	0.0740	0.7400	0.0462
HLD39	0.3378	0.6621	0.2972	0.1678	0.3878	0.6121	0.3473	0.0624	0.7115	0.0613
HLD84	0.2972	0.7027	0.2702	0.1567	0.4214	0.5785	0.3305	0.0520	0.6851	0.0443

DIP (-), Deleción; DIP (+), Inserción; (Ho), Heterocigosidad observada; (He), Heterocigosidad esperada; PC, Probabilidad de Coincidencia; PD, Poder de Discriminación; PIC, Contenido de Información Polimórfica; (PE), Poder de Exclusión; ITP, Índice Típico de Paternidad; (EHW), Equilibrio Hardy-Weinberg. * Valor significativo después de la corrección de Bonferroni ($p < 0.0017$).

Al emplear en este estudio, marcadores de tipo autosómico, se buscó indagar acerca de la variación de la recombinación en la herencia biparental de diferentes loci, dado que esto permite proponer supuestos e hipótesis de la historia de las poblaciones, aunque el contenido polimórfico para los Indels es limitado, es posible analizar fenómenos de estructura y subestructura poblacional.

Los Indels no son altamente polimórficos en comparación con los STRs, por lo tanto de forma individual son menos informativos, allí radica la importancia de analizar una batería amplia de Indels que logren alcanzar un Poder de Discriminación (PD) significativo y relativamente similar a los STR como lo sugiere Gusmao *et al.*, (2013) cuando el objetivo es dar respuesta a temas referentes al estudio de estructura poblacional, al igual que resolver casos de identificación de personas desaparecidas y filiación biológica, así mismo hay una gran variedad de publicaciones donde se muestra el análisis de marcadores autosómicos como los STR encaminados a aportar a la estimación de los índices forenses y de paternidad para varias regiones de Colombia como lo muestran Paredes *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; y Olarte *et al.*, 2010, de los cuales se suministra información para resolución de casos de desaparición de personas y filiación biológica además de ser usados en pruebas de identificación humana y criminalística, con el presente estudio se busca complementar con los marcadores Indels la resolución de dichos casos.

Con base en los valores mostrados en las Tablas 3-1, 3-2, 3-3 y 3-4 referentes a los índices forenses y de paternidad; se puede inferir, que la caracterización de los 30 Indels utilizados en este estudio son informativos y útiles para complementar a los STR en casos de identificación de desaparecidos y en estudios de filiación biológica en individuos y víctimas de la región suroccidental de Colombia como lo es el pacífico, Olarte *et al.*, (2010), pues si bien es cierto, las pruebas de paternidad y de identificación de individuos basan sus análisis estadísticos relacionando las frecuencias alélicas de los marcadores moleculares en las poblaciones donde sucedieron los hechos, Moroni *et al.*, (2008).

3.1 Resultados y discusión de datos estadísticos y parámetros forenses

Se estimó para cada uno de los Indels en los cuatro departamentos el equilibrio Hardy-Weinberg, se encontró que de acuerdo a lo estimado en los 30 Indels tanto la población total como los departamentos están en equilibrio, después de aplicar la corrección de Bonferroni. (B.S. Weir, 1996) ($\alpha=0.05/30=0.0017$) $P > 0.0017$ donde no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de Indels en los cuatro departamentos lo cual indica que se encuentran en equilibrio (EHW), a excepción de HLD136 en el departamento del Chocó (0,0001), HLD88 en el departamento de Nariño (0,0001) y HLD39 en el departamento del Cauca (0,0001), esto debido probablemente a un déficit de heterocigotos.

En las cuatro poblaciones el locus con el Poder de Discriminación (PD) más alto fue el HLD84 (0.6652) en el departamento del Chocó, el HLD67 (0.6645) en el departamento de Nariño, el HLD92, el HLD133 (0.6638) en el departamento del Cauca y el HLD45 (0.6661) en el departamento del Valle del Cauca, estos valores de PD muestran la probabilidad que existe en que dos individuos tomados al azar, en la misma población, posean diferentes genotipos, y esto está mediado por la Heterocigosidad de cada sistema como lo menciona Jones, (1972), por tanto entre mayor sea el Poder de Discriminación (PD) disminuye la probabilidad de concordancia para cada marcador genético. Por tanto la Heterocigosidad y el PD se complementan. En estudios recientes de la población de Xinjiang Uigur, grupo étnico de China, se encontró un PD combinado y una PE combinada de 0.999999999999940 y 0.9963, respectivamente como lo menciona Zhang *et al.*, (2016), datos similares fueron obtenidos para la población del sur de Brazil como lo describe Souza *et al.*, (2014), lo que permite inferir que el Kit DIPplex® brinda un gran potencial en los análisis forenses.

El locus con contenido de información polimórfica (CIP) más alto es el HLD6 (0.3750) en el departamento del Chocó, los loci HLD111, HLD92, HLD67 y HLD84 (0.3749) en el departamento de Nariño, los loci HLD45, HLD58, HLD101 y HLD125 (0.3748) en el departamento del Cauca y los loci HLD124 y HLD128 (0.3750) en el departamento del Valle del Cauca.

El valor promedio de la heterocigosidad observada (H_o), para la población total es decir para toda la región Pacífica es de 0.3984, mientras que entre las subpoblaciones clasificadas por departamentos (Chocó, Nariño, Cauca y Valle del Cauca) los valores de H_o están entre 0.3534 y 0.4203 lo que demuestra que la diversidad de las poblaciones es similar. Para los diferentes marcadores Indel, la menor Heterocigosidad observada (H_o) está en el sistema HLD101 para el departamento del Chocó (0.2758), HLD88 para el departamento de Nariño (0.1875), HLD6 para el departamento del Cauca (0.1951) y HLD48 para el departamento de Valle del Cauca (0.2432).

El valor de Heterocigosidad observada (H_o) promedio total de la región pacífica (H_o : 0.3984) están un poco por debajo de los valores promedio para poblaciones de Sur América como Uruguay (0.4834) según lo reportado por Pagano *et al.*, (2014) y Brasil (0,4727) según lo menciona Alfonso *et al.*, (2017) datos que se observan en la Tabla 3-5., esto puede evidenciar que la población de la región pacífica sometida a continuos procesos de mezcla por desplazamiento y migraciones tiene una diversidad genética un poco menor que otras poblaciones con una menor influencia migratoria.

Así mismo se encontró que todos los Indels mostraron un nivel de polimorfismo con intervalos en el departamento del Chocó (H_e : 0.2142 a 0.3126), Nariño (H_e : 0.1836 a 0.3224), Cauca (H_e : 0.1303 a 0.2074), y Valle del Cauca (H_e : 0.1738 a 0.1875). Probablemente estos marcadores hicieron que el Poder de discriminación individual en Nariño, Cauca y Valle del Cauca se redujera. Por lo tanto, es razonable mejorar el Kit de marcadores Indels mediante la identificación de nuevos Indel con niveles de Heterocigosidad Esperada (H_e) más alta en la población de la Región del Pacífico colombiano.

9 Tabla 3-5

Valores comparativos de Heterocigosidad Observada de países de sur América (Brasil y Uruguay) y los departamentos de la región Pacífica colombiana.

Marcador Cauca	Ho Brasil ^a	Ho Uruguay ^b	Ho Chocó	Ho Nariño	Ho Cauca	Ho Valle del
HLD77	0.4831	0.4809	0.3275	0.3906	0.2682	0.3243
HLD45	0.4783	0.5038	0.3965	0.2812	0.3902	0.3243
HLD131	0.4106	0.5802	0.3103	0.3593	0.3170	0.3783
HLD70	0.4444	0.5191	0.2068	0.2812	0.3170	0.4054
HLD6	0.4734	0.4351	0.5172	0.3437	0.1951	0.4864
HLD111	0.4541	0.5191	0.3793	0.4843	0.3170	0.2702
HLD58	0.5217	0.5878	0.4310	0.4843	0.2439	0.4054
HLD56	0.4879	0.4504	0.3103	0.3125	0.3658	0.2972
HLD118	0.4541	0.4733	0.3965	0.3906	0.4878	0.5135
HLD92	0.4348	0.3893	0.4482	0.4531	0.3414	0.4324
HLD93	0.4589	0.4504	0.3620	0.2343	0.3658	0.3243
HLD99	0.5507	0.4504	0.4310	0.5625	0.3902	0.4324
HLD88	0.4638	0.5344	0.3448	0.1875	0.9756	0.4594
HLD101	0.5217	0.5420	0.2758	0.5000	0.3902	0.4054
HLD67	0.4493	0.5420	0.3793	0.2968	0.3170	0.5135
HLD83	0.4155	0.4428	0.4482	0.5156	0.6097	0.4324
HLD114	0.5073	0.4428	0.2931	0.5781	0.5365	0.4594
HLD48	0.4928	0.4809	0.1724	0.2187	0.2439	0.2432
HLD124	0.4541	0.4733	0.5344	0.3906	0.4390	0.4054
HLD122	0.5362	0.4809	0.3275	0.5781	0.5609	0.6486
HLD125	0.4686	0.4657	0.5172	0.6406	0.5853	0.6216
HLD64	0.3913	0.5038	0.1724	0.2968	0.3902	0.3513
HLD81	0.5411	0.4275	0.3793	0.3906	0.3902	0.2972
HLD136	0.4541	0.4504	0.1551	0.5156	0.7317	0.4864
HLD133	0.4541	0.5115	0.4482	0.4843	0.3658	0.4594
HLD97	0.4106	0.4733	0.2241	0.3750	0.2926	0.5405
HLD40	0.4831	0.4199	0.4137	0.5000	0.5609	0.4054
HLD128	0.5121	0.4580	0.3620	0.5000	0.4146	0.3243
HLD39	0.5217	0.4733	0.2586	0.4531	0.4878	0.2972
HLD84	0.4541	0.5420	0.3275	0.3906	0.3170	0.2702
TOTAL	0.4727**	0.4834**	0.3525**	0.4130**	0.4203**	0.4072**

- a. Datos tomados del material suplementario: Pagano *et al.*, Allelic frequencies and statistical data from 30 INDEL loci in Uruguayan population (2014).
- b. Datos tomados del material suplementario: Afonso C. *et al.*, Genetic characterization of the Brazilian immigrant population in Lisboa with InDel genetic markers. (2017).
- ** Promedios totales de Heterocigosidad Observada Ho en cada población.

La Tasa de Probabilidad de Coincidencia (PC) y el Poder de Exclusión (PE) acumulado promedio de los 30 Indels respectivamente fueron mayores en el departamento de Nariño (0.6118 y 0.1376) seguido de Chocó (0.6016 y 0.0933), y menores en la población del Cauca (0.3957 y 0.1234) y Valle del Cauca (0.3837 y 0.1275). La Probabilidad de Coincidencia (PC) muestra la similitud genética para cada Indel en los cuatro departamentos (Chocó, Nariño, Cauca y Valle del Cauca) y permite comparar dos individuos de la misma población tomados al azar según lo indican Gaissmaier y Schooler, (2008).

En genética forense y en los análisis de identificación de personas desaparecidas es importante el Índice Típico de Paternidad (ITP) y la Probabilidad de Exclusión (PE) tal y como lo describe Carracedo *et al.*, (1996) los cuales para los 30 Indels en cada una de las cuatro poblaciones se distribuyen así: para el departamento de Chocó el rango de ITP es de (0.5918 a 1.0740) seguido de Nariño (1.3913 a 0.6530), en la población del Cauca (1.8636 a 0.5256) y Valle del Cauca (1.4230 a 0.6607). El poder de exclusión (PE) es una probabilidad muy útil como lo sugiere Morroni *et al.*, (2008), se define como los individuos que poseen un perfil genético que difiere del perfil de cualquier otro individuo seleccionado al azar en una muestra, para el presente estudio en las cuatro poblaciones el PE muestra los siguientes rangos: para el departamento de Chocó el rango es de (0.0187 a 0.2194) seguido de Nariño (0.0264 a 0.3424), en la población del Cauca (0.0021 a 0.4789) y Valle del Cauca (0.0426 a 0.3533).

Para conocer la eficiencia de los Indels en pruebas de filiación biológica, se puede hacer a través de una evaluación específicamente para loci bialélicos. Esto se obtiene multiplicando dos veces el número de loci por el promedio de diversidad genética y corresponde al número de SNPs informativos (aquellos con frecuencias alélicas iguales) necesarias para llegar al mismo Poder de Exclusión (PE) en paternidades (M. Krawczak, 1999).

3.1.1 Análisis de Estructura en la Región Pacífica colombiana

Para el análisis de subestructura en la población del pacífico colombiano se evaluó la hipótesis de agrupamiento de los cuatro departamentos (Chocó, Nariño, Cauca y Valle del Cauca). La estimación de los Estadísticos-F de acuerdo a lo publicado por Weir y Cockerham, (1984) y los valores F_{ST} entre las subpoblaciones corresponden a una estructura genética baja, de acuerdo con la escala de Wright donde los valores oscilan entre 0 y 0.5 lo cual se observa en la Tabla 3-6, el valor de diferenciación subpoblacional total F_{ST} (Theta) fue 0.0162 con un intervalo de confianza de 0.002 y un p-valor de 0.5 estos valores de F_{ST} bajos sugieren una muy fuerte similitud entre estas poblaciones.

La estructura genética baja se puede explicar al analizar estas poblaciones de la región del Pacífico que en general se encuentran en equilibrio y se puede inferir que hay apareamientos aleatorios, que llevan a una gran variabilidad genotípica, también puede haber una marcada influencia de los procesos de mezcla entre poblaciones, Rondón *et al.*, (2008) y los procesos históricos de mestizaje en el país como lo relata Olarte *et al.*, (2010).

10 Tabla 3-6

Índice de fijación FST Indel por Indel con ANOVA producto del análisis de Frecuencias alélicas entre los cuatro departamentos del Pacífico colombiano.

MARCADOR	FST	MARCADOR	FST
HLD77	0.0161	HLD83	0.0332
HLD45	0.0024	HLD114	0.0289
HLD131	0.0597*	HLD48	0.0066
HLD70	0.0128	HLD124	0.0561*
HLD6	-0.0069	HLD122	0.0439
HLD111	0.0042	HLD125	0.0046
HLD58	0.0158	HLD64	-0.0097
HLD56	-0.0040	HLD81	0.0311
HLD118	-0.0052	HLD136	0.0370
HLD92	0.0270	HLD133	-0.0016
HLD93	0.0030	HLD97	-0.0040
HLD99	0.0027	HLD40	0.0189
HLD88	0.0117	HLD128	-0.0111
HLD101	0.0523	HLD39	0.0292
HLD67	-0.0112	HDL84	0.0311
		Total	0.0162

* Valor de FTS moderado según la escala de Wright (0.05 – 0.15) p-valor de 0.5

Se realizó análisis bayesiano para asignar cada individuo a su respectiva población basado en la información genotípica. Teniendo en cuenta que de forma a priori se clasificó la población de la región Pacífica por departamentos (Chocó, Cauca, Nariño y Valle del Cauca) se realizó el cálculo de la distribución de frecuencias alélicas a posteriori asumiendo que la población está en equilibrio de Hardy Weinberg, posteriormente al evaluar los valores de probabilidad (LnP) como se muestra en la Tabla 3-7, teniendo en cuenta la agrupación por departamentos se encontró un mejor ajuste en K=1 como se

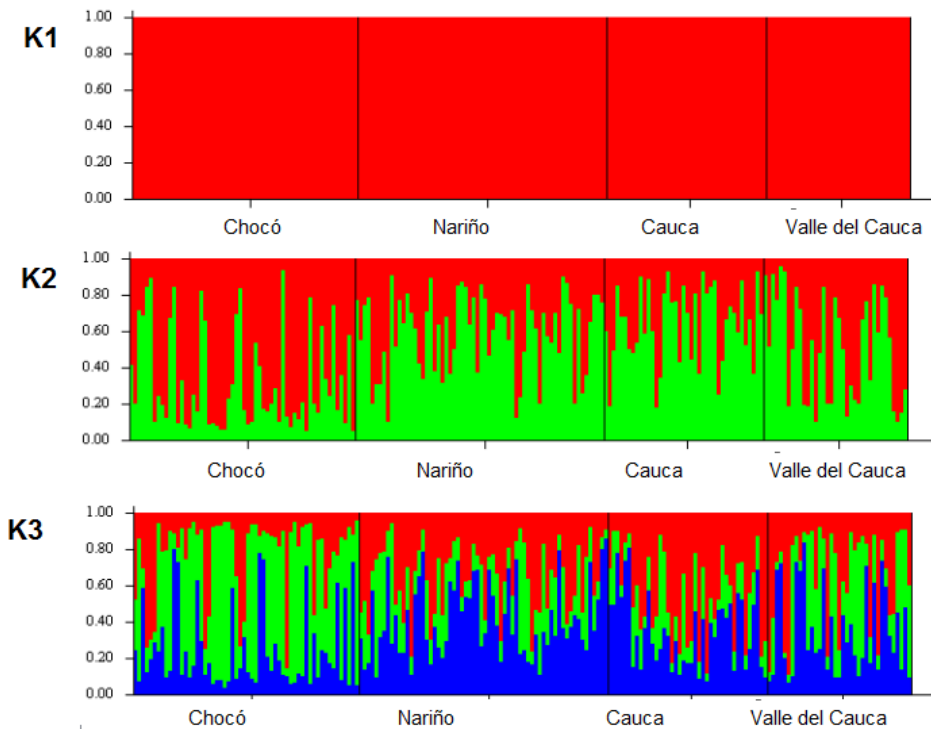
observa en la Figura 3-2; por lo tanto, se confirma que no hay subestructura poblacional y no habría lugar a agrupaciones desde el punto de vista genético.

11 Tabla 3-7

Valores de la probabilidad (LnP) para cada número de agrupaciones (K).

K	Ln P(D)	Fst_1	Fst_2	Fst_3	Fst_4	Fst_5
1	-8082.2	0.0117	-	-	-	-
1	-8082.2	0.0064	-	-	-	-
2	-8042.5	0.1636	0.0571	-	-	-
2	-8031.9	0.0928	0.0224	-	-	-
3	-8023.8	0.1435	0.0834	0.1004	-	-
3	-8057.1	0.1032	0.1407	0.0386	-	-
4	-7999.0	0.0927	0.0771	0.0616	0.1293	-
4	-8079.3	0.0767	0.1396	0.0982	0.0749	-
4	-8179.3	0.0271	0.1400	0.0926	0.0830	-
5	-8087.2	0.1566	0.1141	0.2062	0.1691	0.1377
5	-8044.6	0.0837	0.1045	0.0959	0.1451	0.0673

Figura 53-2 Graficas de barras para los valores Q de asignación de individuos para una, dos y tres agrupaciones K.



Al evaluar la estructura genética en los datos agrupándolos previamente por la ubicación del muestreo es decir por departamentos, se obtuvo por medio de análisis bayesiano de clusters el número más probable de clusters (K) presentes como lo indica Pritchard *et al.*, (2000). Cada potencial número de clusters (K = 1 a 5) se ejecutó 10 veces con 10.000 repeticiones. Para cada corrido se esperaba el modelo de mezcla a partir de la correlación de frecuencias alélicas dentro de las poblaciones. Para inferir el número más probable de clusters, el software STRUCTURE determina un valor de verosimilitud posterior $\ln P(D)$ para cada ejecución y estos valores se compararon entre corridos y repeticiones para determinar el valor de K más probable para los datos.

Como se mencionó anteriormente al ejecutar el software STRUCTURE para el conjunto de cuatro poblaciones del departamento del Pacífico, se encontró que el número óptimo de grupos genéticos, que corresponde a la mayor probabilidad posterior, fue K = 4 (Tabla 3-6), aunque las estadísticas también dieron soporte para K = 1. El análisis se realizó a partir de la correlación de frecuencias y la información previa sobre el lugar de muestreo donde, para cada individuo el programa identifica la fracción del genoma al que pertenece en cada una de las agrupaciones.

En estudios realizados para comparar otras poblaciones como el realizado por Zhang *et al.*, (2016) donde se compararon 21 poblaciones de diferentes regiones del mundo se marca una notoria estructura en la cual los grupos asiáticos fueron separados de grupos amerindios y europeos y a su vez se separan claramente los grupos amerindios de los grupos europeos. Esto muestra que el componente genético de cada país es prácticamente único, y por tanto, los resultados obtenidos en el estudio aquí realizado para la población de la región del Pacífico no mostró subestructura por tratarse de una población genéticamente similar.

3.2 Conclusiones

Al realizar el análisis genético y descriptivo de la población de la región Pacífica por medio de Indels autosómicos es posible hacer inferencias más adecuadas correspondiendo a criterios que den cuenta de la dinámica de poblamiento y a los procesos históricos específicos de la población.

Gracias al trabajo realizado en este estudio se corrobora que los cuatro departamentos de la Región del Pacífico colombiano pueden diferenciarse entre zonas quizás a sus características históricas y socioculturales, pero desde el aspecto genético y al evaluar subestructura por medio de las frecuencias alélicas de los 30 Indels, no se encuentran diferencias genéticas entre los departamentos del Chocó, Nariño, Cauca y Valle del Cauca, planteados a priori, evidenciado por la falta de significancia de los valores de F_{ST} y en la asignación individual para formar agrupaciones.

La falta de hallazgo de subestructura indica que la población es mezclada y soporta la idea donde se asegura que se han presentado procesos de migración desde la época de la conquista española propuesta por Rondón *et al.*, (2008), por tanto, el intercambio de genes entre poblaciones, es una fuente de diversidad genética. A pesar, que se puede presentar una alta variabilidad genotípica, las frecuencias alélicas para la población de la región pacífica no varían, describiendo una población homogénea.

Con el pasar del tiempo en Colombia se ha visto un gran esfuerzo por caracterizar la diversidad genética y cultural de sus habitantes dando diversos enfoques metodológicos, pues, los análisis y publicaciones de Indels autosómicos en la población colombiana son escasos, es así como la mayoría de los mismos se han concentrado en comunidades nativas como el realizado por Builes *et al.*, (2013), no obstante, en este estudio el análisis con marcadores genéticos Indels autosómicos incluidos en el kit comercial DIPplex® se enfocó en caracterizar y describir las frecuencias alélicas y estimadores de uso forense, en relación con la importancia histórica y social de los departamentos del Chocó, Nariño, Cauca y Valle del Cauca, y de esta manera, poder contribuir a enriquecer el estudio de esta región del país.

Los resultados obtenidos concluyen que los cuatro departamentos aquí estudiados están estrechamente relacionados tanto en su componente histórico como genético, hecho que se ve reflejado en el análisis descriptivo de los datos. Así mismo se evaluó la aplicabilidad forense del Kit DIPplex® en las cuatro poblaciones de la región Pacífica. Los niveles de Poder de Discriminación (PD) y los bajos niveles de FST sugieren que estos marcadores genéticos son adecuados para su uso en casos forenses de dicha región.

La población de Nariño, Cauca, Chocó y Valle del Cauca se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y presenta una alta diversidad genética, lo cuál demuestra que dichas poblaciones están sometidas a continuos procesos de mezcla, por eventos migratorios históricos y actuales. La evaluación de la estructura genética de la población arrojó bajos valores de F_{ST} para los marcadores usados, indicando que estos departamentos se están comportando como una sola población, posiblemente por sus ubicaciones geográficas y además porque se está presentando un constante intercambio de individuos entre las poblaciones.

4. Análisis en muestras de tipo forense para identificación humana

Entre las consideraciones relevantes del presente estudio, se encuentra la aplicación del Kit DIPplex® de Quiagen en procesos de identificación humana. Entendiendo que este método puede ser usado en cualquier caso forense y adaptándolo acorde a la necesidad, es decir, para casos donde escasea el ADN o está degradado y fragmentado, el tamaño de los amplicones es relevante.

Pese a que los análisis forenses para identificación de personas desaparecidas se realiza a través de restos óseos sometidos a diversos escenarios ambientales adversos y agentes dañinos o fuentes de contaminación, para tratar este tipo de muestras, se debe desarrollar un sistema de análisis sensible, procurando controlar la mayoría de variables involucradas para poder obtener resultados.

En el aspecto técnico, el principal objetivo es disponer de una batería de amplicones con el menor tamaño posible y optimizar el número de ciclos de amplificación de las reacciones de PCR. El aspecto analítico también es fundamental, enfocado en la utilidad informativa en el campo forense, pues, se dispone de una gran variedad de marcadores, pero se debe contar con bases de datos de frecuencias alélicas que sean representativos de la población objeto de estudio y donde se desarrolló un hecho involucrado en forense.

Para confirmar que los marcadores genéticos Indels son un complemento a las metodologías estándar de identificación de personas desaparecidas se deben poner a prueba en la gran variedad de fuentes biológicas, que en el quehacer diario de un laboratorio de genética forense se encuentran por ejemplo: restos óseos expuestos a procesos fisiológicos y ambientales adversos como lo indica Milós *et al* (2007), muestras incluso diluidas de evidencia traza como saliva, orina, cabello, deferentes tipo de tejidos, uñas y semen.

Por tanto en este estudio se incluyó el análisis de un resto óseo de un caso real de desaparición forzada sometido a la erosión de tipo tafonómico y ambiental para el cual se describirá la metodología usada.

4.1.1 Extracción de ADN de resto óseo

Se analizó un resto óseo largo exhumado en zona rural del departamento de Nariño perteneciente a la región del Pacífico colombiano, debido a la pérdida de extremos (epífisis) no se describió el nombre de dicho hueso, se aplicó el protocolo de extracción rutinario en el laboratorio para este tipo de muestras, el cual es el que corresponde a desmineralización total, se basa en el uso de columnas de sílice de Quiagen desarrollado en ICMP y propuesto por Huel, S. *et al*.

4.1.2 PCR-RealTime para la Cuantificación de ADN

Para ello se utilizó el Kit de cuantificación Quantifiler® Human DNA (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante y con el uso del equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, así se determinó la cantidad total de ADN humano posible de amplificar con PCR multiplex convencional en unidades (ng/ μ L) y se estimó la presencia de inhibidores de la polimerasa en el producto de ADN extraído del resto óseo.

4.1.3 Tipificación y Análisis de STR e Indels

El ADN extraído se amplificó por medio de la PCR, inicialmente con el Kit de STRs PowerPlex Fusion® (Promega), posteriormente se amplificó el kit comercial Investigator DIPplex® de (Qiagen) modificándose de 30 ciclos a 35. Todo el proceso de laboratorio se

realizó de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante y con los parámetros según Neuvonen. (2012), Turrina et al. (2011), Zidkova et al. (2013) y LaRue B. (2012), las condiciones de PCR se realizaron según el protocolo recomendado por el fabricante del Kit DIPplex® de (Qiagen).

El equipo de genotipificación de Indels fue un analizador genético de electroforesis capilar ABI 3130XL, se utilizó una matriz capilar de 36 cm y polímero POP-4 para corrido, el Size standard es el BTO 550 (Qiagen), las muestras fueron inyectadas durante 18 segundos a 3 kV y se sometieron a electroforesis durante 1000 segundos a 15 kV y a una temperatura de 60 C°. Para la identificación de los polimorfismos se utilizó el software GeneMapper® ID-X (Applied Biosystems, Foster City, California) donde se realizó la asignación alélica correspondiente.

4.2 Evaluación del método en casos de Identificación humana sin resultados o con escaso ADN

Como científicos forenses, los casos no concluyentes o negativos no son fáciles de manejar, aunque no son frecuentes, cuando suceden hay que informar y dar cuenta de un resultado, lo que conlleva al desgaste y frustración del equipo humano y de los recursos invertidos en tratar de obtener resultados, a pesar de saber las implicaciones que ello conlleva en un caso de identificación de personas desaparecidas, el esfuerzo por dar un resultado certero no cesa.

Por esta razón, en este estudio se planteó la evaluación de la sensibilidad y eficiencia del uso del kit de Indels DIPplex® en un resto óseo en malas condiciones de conservación como se muestra en la Figura 4-1, con resultados no concluyentes en la Fiscalía General de la Nación para STR, al cual, a pesar de múltiples intentos y la adopción de estrategias técnicas en cuanto a extracción de ADN y mini STR, no se obtuvo un resultado concluyente.

Figura 6 4-1 Imagen del Resto óseo analizado



En la imagen se evidencia el estado de los restos óseos bastante deteriorados, sin epífisis y difíciles de clasificar y nombrar debido a su fragmentación.

Lo que entra en materia de discusión es la valiosa importancia en lograr obtener un perfil genético que permita identificar al desaparecido, pues aunque existan evidencias a priori como los datos antropológicos y demás señales de la desaparición, en la mayoría de los casos, el análisis genético es la única posibilidad de alcanzar un resultado en el proceso de identificación, además, las evidencias antemortem en general son escasas. Encontrar integridad del ADN es de suma importancia en las muestras forenses, pero infortunadamente los expertos deben enfrentar el inconveniente de hallar degradación o contaminación. Tanto para los restos óseos como para las muestras biológicas recuperadas en el lugar de los hechos es común hallar degradación del ADN causada por detergentes, blanqueadores y otros compuestos químicos, además de la exposición en el ambiente a contaminantes microbiológicos, tafonomicos, fúngicos además de la acidez y humedad de los terrenos.

Con el avance de la tecnología se han logrado implementar kits para la amplificación de ADN en muestras biológicas con fines forenses, que sobrepasan la barrera de la degradación y la inhibición, pese a ello, existen casos en los que no es posible obtener resultados probablemente porque el ADN está muy afectado en su integridad.

4.3 Resultados y discusión de los análisis del resto óseo

La cuantificación por PCR Real Time indicó que había un resultado indeterminado ng/ μ L de ADN humano, con un IPC de 35, lo que indica que hay presencia de inhibidores de la reacción de PCR, en la medida que se presenten valores por encima de 30, se puede interpretar como la presencia de inhibidores. En otros trabajos se ha hecho la degradación artificial del ADN como lo muestra Vallone *et al.*, (2012) donde fragmentaron de manera controlada el ADN de cadenas conocidas por medio de vibración con equipos de sonificación, de igual forma no pudieron simular la inhibición, a diferencia del resto óseo analizado en el presente estudio, es un caso donde hay degradación e inhibición real, lo cual muestra un enfoque de la realidad de la casuística forense en el país.

En la Figura 4-2 se observa la tipificación de marcadores STRs autosómicos con el kit PowerPlex Fusion® (Promega), para la muestra cuantificada, es evidente el resultado no concluyente en el electroferograma, donde, por parámetros de validación interna en el laboratorio de la Fiscalía General de la Nación, solo se da asignación alélica a aquellos picos que superan los 80 RFU (Unidades de Fluorescencia Relativa).

Respecto al estado desde el punto de vista físico y morfológico que presentaban las muestras de resto óseo largo y según la cuantificación de ADN en la que había un resultado indeterminado era de esperarse que no se obtuvieran resultados concluyentes para STR. Después de someter los productos de ADN a PCR con el kit DIPplex® se encontró que la metodología aquí descrita y la amplificación del ADN degradado con el kit de Indels mejoró cuando el número de ciclos en la PCR multiplex se aumentó de 30 a 35, por tanto, en aquellos regiones donde el ADN estaba en mal estado, se evidencia una amplificación de mejor calidad versus la ausencia de amplificadas con STR.

En la figura 4-3 se observan los resultados que proveen los Indels con notable desbalance, sin embargo, es un acercamiento a un resultado mas confiable, incluso, los niveles de RFU superan el umbral establecido en el laboratorio es decir mas de 80 RFU para ser asignado a un alelo verdadero, lo cual a su vez demuestra que los amplicones con tamaños inferiores a 150 pb, si aportan resultados en estos casos de ADN fragmentado.

Controlar del desbalance de picos en este tipo de casos es complicado debido a que no se puede establecer si la región del ADN a amplificar se encuentra en un estado aceptable, por tanto, la amplificación será de baja calidad respecto a los amplicones que están en buen estado. De acuerdo a la experiencia, es útil emplear pasos adicionales en los procesos de extracción del ADN, e incluso se aconseja incrementar los tiempos de tratamiento como lo indica Valverde *et al.*, (2013).

El impacto ambiental sobre las muestras de tipo forense conlleva a la degradación del ADN. Por tanto, la tipificación de Indels en este estudio, para amplificar ADN degradado fue ideal, caso contrario que no sucede con los STRs en estas muestras con ADN en mal estado.

Figura 74-2 Electroferograma de STR del kit PowerPlex Fusion® para un Resto óseo

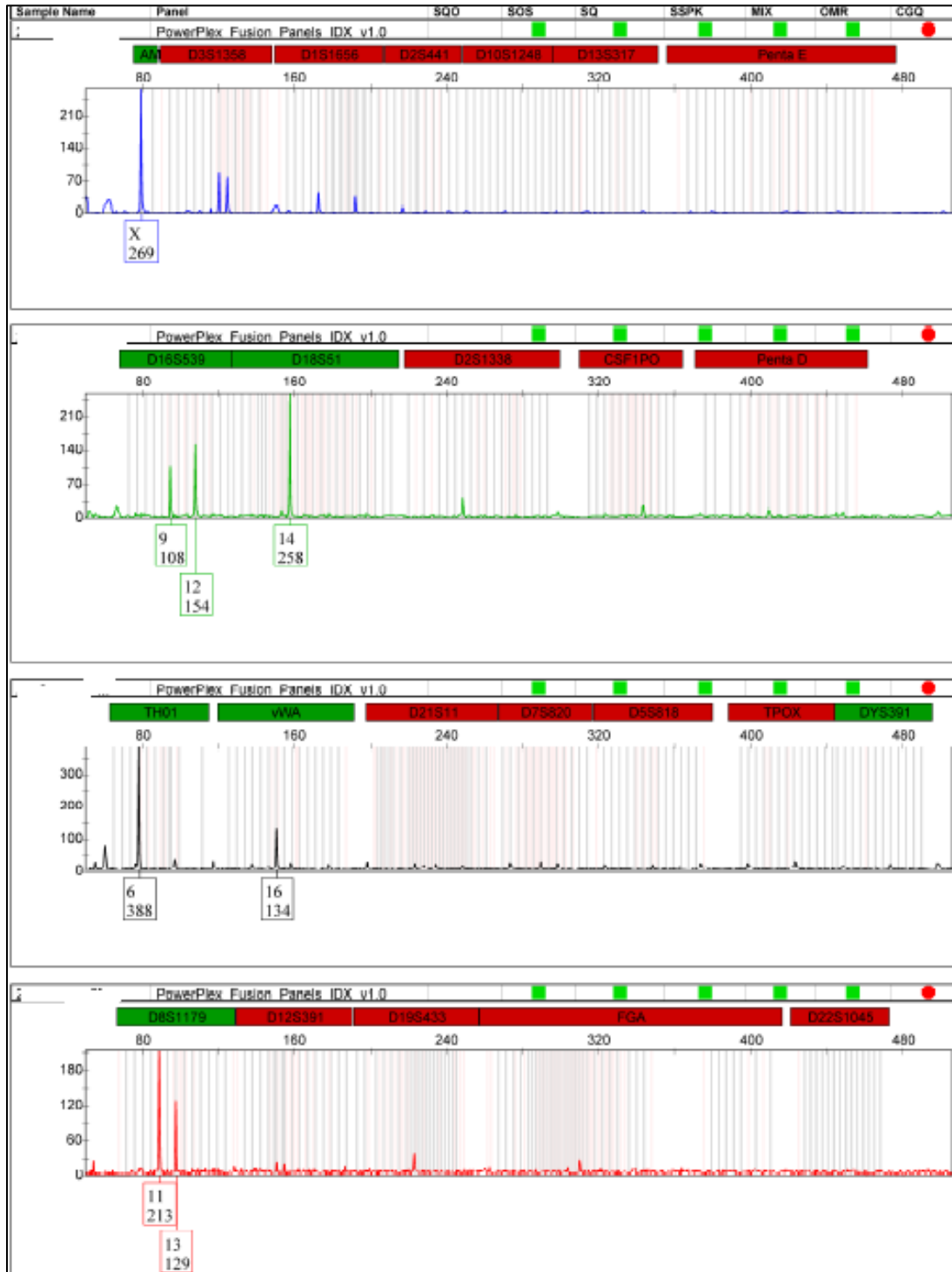
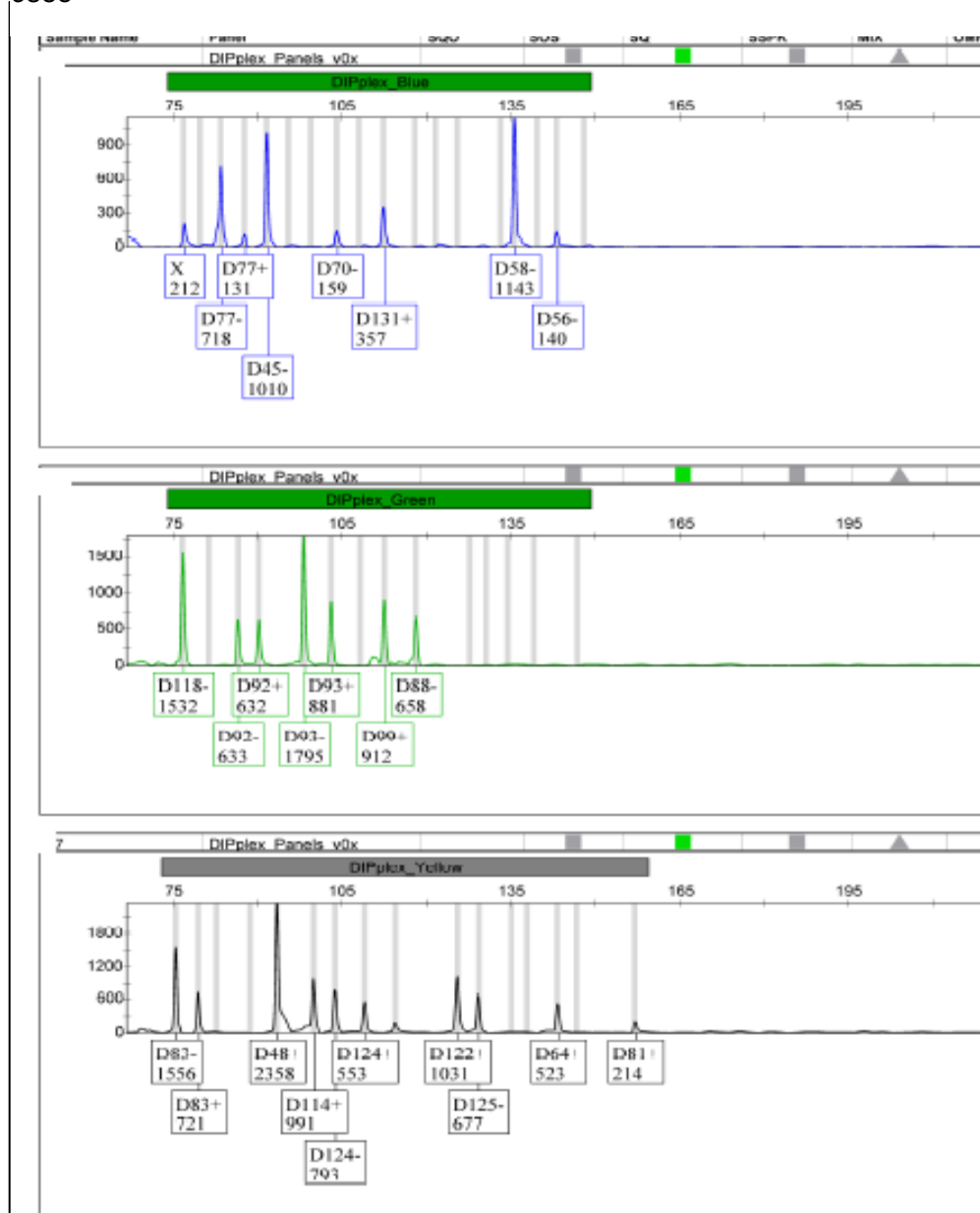


Figura 8 4-3 Electroferograma de Indels del kit DIPplex® para un Resto óseo



De acuerdo a la Figura 4-2 y a la Figura 4-3 se evidencia que los resultados para muestras con un alto grado de degradación tienen un mejor rendimiento con los Indels. Por tanto es una técnica que rompe la brecha que separaba los resultados negativos de un resultado exitoso.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones generales

A diario se observa como la genética hace parte de la cotidianidad, pues, con ella es posible confirmar relaciones de parentesco, conocer la predisposición a desarrollar enfermedades, y comprender con mayor profundidad el funcionamiento de nuestro organismo. Es así, que desde sus inicios, la genética ha sido una excelente herramienta en el desarrollo de otras ciencias como la antropología y la arqueología y el campo judicial, donde en variadas ocasiones las pruebas de ADN prácticamente han resuelto casos del campo de la criminalística y se han convertido en la última palabra para casos de desaparición de personas donde no hay evidencia no genética.

Con este estudio se enriquece y se aporta a la escasa información genética y forense para la región del Pacífico colombiano en cuanto a marcadores Indels autosómicos respecta.

En entidades públicas colombianas como la Fiscalía General de la Nación, en la Dirección de Fiscalía Nacional Especializada de Justicia Transicional se reporta el hallazgo de 6.570 cadáveres que se recuperaron en fosas clandestinas y cementerios, en un periodo comprendido entre 2006 y 2016, 3.105 de ellos equivalente al 47% han sido identificados y entregados a sus familiares, pero a la fecha siguen sin identificar 3.465 cadáveres, desconociéndose hasta el momento una propuesta metodológica por parte del Estado para la identificación de este 53% restante por tanto con este estudio se aporta al conocimiento científico para cooperar con la identificación de los restos óseos con resultados negativos hasta la fecha en la región del Pacífico colombiano.(Derechos Humanos 2016).

La región del Pacífico según (DANE 2005) es conocida como una sociedad diversa con presencia de población indígena, afrocolombiana y mestiza, esto conlleva a que esta región del país sea un marco de estudio genético-poblacional del que se puede obtener referencia en el análisis de casos con aplicaciones forenses, por ello, en respuesta a la limitada disponibilidad actual de estudios o publicaciones de frecuencias alélicas con marcadores genéticos Indels autosómicos y a la inminente necesidad de identificación de personas desaparecidas y casos de filiación biológica en esta región de Colombia, este trabajo deja un registro preliminar del análisis de estos marcadores con aplicabilidad forense.

Además de su potencial utilidad en casos de paternidad debido a su baja tasa de mutación, los Indels también pueden aplicarse eficazmente a casos como la identificación individual de personas, especialmente de muestras degradadas, la principal ventaja del kit DIPplex® es que los datos se pueden obtener por medio de herramientas utilizadas para el análisis de STR de rutina y no requieren cambio en el flujo de trabajo del laboratorio como se evidenció al obtener resultados en la amplificación de Indels con un resto óseo negativo o no concluyente para STR.

Se demostró que estos 30 loci de marcadores Indel son una herramienta útil para la identificación forense, especialmente en casos desafiantes de ADN degradado en Colombia. Aunque el kit DIPplex® mostró un menor poder combinado de exclusión (PE) que los STRs, la baja tasa de mutación de estos marcadores Indel presumiblemente ayuda a distinguir las exclusiones verdaderas en las pruebas de paternidad. Esto proporcionará una herramienta complementaria para el análisis de parentesco con STRs.

Es importante aclarar que el caso del resto óseo aquí mostrado dio como resultado con los análisis de marcadores STRs un perfil parcial, sin la amplificación de la mayoría de sistemas. Cualquier resultado que se obtenga por más mínimo que sea, es considerado como una ganancia en el proceso de identificación de personas desaparecidas en el país.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda llevar a cabo estudios similares en otras regiones de Colombia y en otros países de Latinoamérica, como complemento y mejora de este estudio se sugiere realizar análisis de ADN mitocondrial y de cromosoma Y con las muestras aquí trabajadas para obtener información sobre el origen de la población, así mismo poder incluir en las comparaciones las poblaciones nativas indígenas, también resultaría interesante realizar análisis discriminando por género para establecer si hay diferencias en las frecuencias alélicas entre hombres y mujeres.

Anexo 1: Consentimiento Informado



PROGRAMA DE BANCO DE MUESTRAS DE SANGRE DE FUNCIONARIOS
LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE – FORMATO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

DATOS PERSONALES	
APELLIDOS _____	NOMBRES _____ Doc. Identidad _____ N° _____
Lugar de Nacimiento (Municipio): _____ (Dpto): _____	EDAD <input type="text" value="a"/> GÉNERO F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>
Dependencia: _____	Teléfono: _____ Ext: _____
Durante los últimos 3 meses ha recibido transfusión sanguínea:	SI: <input type="checkbox"/> NO: <input type="checkbox"/>
Ha recibido trasplante de médula ósea:	SI: <input type="checkbox"/> NO: <input type="checkbox"/>
INFORMACIÓN FAMILIAR	
MADRE	
APELLIDOS Y NOMBRES: _____	Lugar de Nacimiento (Ciudad, Depto): _____
PADRE	
APELLIDOS Y NOMBRES: _____	Lugar de Nacimiento (Ciudad, Depto): _____
ABUELA MATERNA	
APELLIDOS Y NOMBRES: _____	Lugar de Nacimiento (Ciudad, Depto): _____
ABUELO PATERNO	
APELLIDOS Y NOMBRES: _____	Lugar de Nacimiento (Ciudad, Depto): _____
Con el fin de evitar duplicidad en la base de datos es necesario analizar únicamente 1 individuo de cada familia.	
¿TRABAJAN OTROS FAMILIARES RELACIONADOS POR VIA MATERNA EN LA FGN?	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

En la ciudad de _____, el _____ de _____ del _____. Firma: _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ identificado con cédula de ciudadanía No. _____ de _____, autorizo la toma de muestra de sangre, como muestra se preservará y almacenará en el Laboratorio de Genética Forense de F.G.N. respetando mi derecho a la intimidad y no será usada con fines diferentes a los de Identificación, estudios genéticos poblacionales y creación de bases de datos, las cuales serán utilizadas como fundamento estadístico para la interpretación de pruebas realizadas por el Laboratorio de Genética Forense de la F.G.N.

FIRMA
C.C.

TESTIGO
C.C.

Bibliografía

A.M. Neuvonen., Discrimination power of Investigator DIPplex® loci in Finnish and Somali populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) e99–e102.

Alfonso C., João M., Reisa F., Vieira da Silva C., António A., Genetic characterization of the Brazilian immigrant population in Lisboa with InDel genetic markers. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, In Press, Accepted Manuscript. 2017.

Alonso A, Martín P, García O, Heinrichs B, Yurrebaso I, Aguirre A, 2013, Population genetic data of 30 autosomal indels in Central Spain and the Basque Country populations, *Forensic Science International: Genetics* 7, e27–e30.

Alonso, L. A., & Usaquén, W. (2013). Y-chromosome and surname analysis of the native islanders of San Andres and Providencia (Colombia). *HOMO-Journal of Comparative Human Biology*, 64(1), 71-84.

Acosta, M. A., Blanco-Verea, A., Lareu, M. V., Brion, M., & Carracedo, A. (2009). The genetic male component of two South-Western Colombian populations. *Forensic Sci Int Genet*, 3(2), e59-61. doi: 10.1016/j.fsigen.

Aprile-Gnisset, Jaques. 1993. Poblamiento, hábitats y pueblos del Pacífico, Cali: Universidad del Valle.

Bailliet, G., Ramallo, V., Muzzio, M., Santos, M. R., Motti, J., Bianchi, N. O., & Bravi, C. M. (2011). Antecedentes y nuevos aportes en el estudio del Cromosoma Y en poblaciones humanas sudamericanas. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 22(1).

Bravo M., Builes J., Pancorbo M., Moreno M. 2004. Analysis of 12 STR loci in Antioquia (Colombia) population simple. International Congress Series 1261: 151-153 p.

Builes J., Martínez B., Gómez A., Caraballo L., Bravo L.,. Y chromosome STR haplotypes in the Caribbean city of Cartagena (Colombia) Forensic Sci. Int, Volume 167, Issue 1 , Pages 62-69. 2007.

Butler JM. Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers. 2nd ed. New York: Elsevier; 2005.

B.S. Weir, Multiple tests, in: Genetic Data Analysis II, Sinauer Associates, USA, 1996 p. 134.

Cai-Xia Li, Yi-Liang Wei, Cui-Jiao Qin, Hui Dong, Jing Jia, 2014, A validation study of a multiplex INDEL assay for forensic use in four Chinese populations Forensic Sci. Int, e22 e25.

Carracedo A., Caraballo L., Gusmão L., Amorim., Martínez B., 2005, Autosomic STR population data in two Caribbean samples from Colombia, Forensic Sci. Int, Volume 152, Issue 1 , Pages 79-81.

Carracedo A. Caraballo L., Barón F., Gusmão L., Amorim A., Martínez B., 2006, Analysis of STR loci in Cartagena, a Caribbean city of Colombia, Forensic Sci. Int, Volume 160, Issue 2 , Pages 221-223.

Carracedo A., Triana O., Gaviria A, Ibarra A., Ochoa L., Posada Y., Palacio O., 2006, Autosomal microsatellite data from Northwestern Colombia, Forensic Sci. Int, Volume 160, Issue 2 , Pages 217-220.

Colpas, J. (enero-diciembre, 2014). Descolonización e interculturalidad en la obra historiográfica de Orlando Fals Borda. Investigium IRE: Ciencias Sociales y Humanas, V (1), 195-208. doi: <http://dx.doi.org/10.15658/CESMAG14.05050112>.

Chung K, Seong K, Park H, Hyun Y, Kang P, Choi D, Han M, 2014, Population genetics of insertion–deletion polymorphisms in South Koreans using Investigator DIPplex kit, *Forensic Science International: Genetics* 8, pg 80–83.

DANE, Censo General 2005. Evidencia reciente del comportamiento de la migración interna en Colombia a partir de la Encuesta Continua de Hogares. Dirección de Metodología y Producción Estadística. <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-general-2005-1>

Domenico De Leo, Stefania Turrina, Giulia Filippini., Forensic evaluation of the Investigator DIPplex® typing system, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3 (2011) e331–e332.

Escobar Arturo., Política cultural y biodiversidad: Estado, capital y movimientos sociales en el Pacífico colombiano., en: Uribe, María Victoria y Restrepo, Eduardo (eds.), *Antropología en la modernidad: identidades, etnicidades y movimientos sociales en Colombia*, Bogotá, Instituto Colombiano de Antropología, 1997, pp. 173-206.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-445.

Espinosa German, 1981, *El Gran libro de Colombia*, Editorial Planeta, P20-27.

Ferdous A, Hosen I, Akhteruzzaman S, Genetic polymorphism of 30 InDel markers for forensic use in Bangladeshi population, (2013) *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4 e348–e349.

Françoise Dureau Olivier Barbary Vincent Goueset Olivier Pissot Thierry Lulle Lecturas cruzadas sobre Colombia CIUDADES Y SOCIEDADES EN MUTACIÓN Coordinadores 2007, UNIVERSIDAD EXTERNADO DE COLOMBIA Primera edición: noviembre de 2007, Ladiprint Editorial Ltda. ISBN: 978-958-716-268-4, Julio de 2009.

Friedemann, Nina S. de, .Estudios de negros en la antropología colombiana., en: Arocha, Jaime y Friedemann, Nina S. de (eds.), Un siglo de investigación social: antropología en Colombia, Bogotá, Etno, 1984, pp. 507-562.

Gaissmaier W., Schooler L. 2008. The Smart Potential Behind Probability Matching". Cognition 109: 416-422 p.

García A, INVESTIGACIÓN De lo regional a lo local en el pacífico sur colombiano, 1780-1930, Historelo.rev.hist.reg.local, Volumen 1, Número 1, p. 76-129, 2009. ISSN electrónico 2145-132X.

Guaque S, Fuentes A, Cárdenas H, Barreto G, 2010, Diversidad y estructura genética de tres poblaciones afro descendientes del sur occidente colombiano a partir de 8 STR's, Acta biol. Colomb., Volumen 15, Número 2, p. 47-60,. ISSN electrónico 1900-1649. ISSN impreso 0120-548X.

Gusmaño L., Vullo C., Borosky A., Catelli M., Romanini C., Fondevila M., Santos C, Pereira R., 2011, Population data for 38 autosomal insertion/deletion (InDels) and 50 SNPS polymorphisms in Argentinean population, Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3 e419–e420.

Gusmaño L., Builes J.J., Ospino J.M., Manrique A., Aguirre D.P, Mendoza L., Bravo, Pereira R., Genetic population data of 38 autosomal InDels for the Amerindian community Embera-Chami of Lapo, Antioquia-Colombia. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4 (2013) e170–e171

Hib, J. De Robertis, E. D. P. 1998. Fundamentos de biología celular y molecular. El Ateneo, 3ª edición, 416 páginas.

Huel,S. Amory,A. Bilic,S. Vidovic,E. Jasaragic,T.J. Parsons, Chapter 13. DNA Extraction form aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis DNA electrophoresis protocols for forensic genetics, methods in molecular biology vol. 830 (Springer protocols), pp. 185-198

Jones D. 1972. Blood simple: probability of discriminations. Journal of Forensic Science Society. 12: 355-359 p.

Keyeux G., Gelvez N., Rodas C. 2003, Mitochondrial DNA Studies Show Asymmetrical Amerindian Admixture in Afro-Colombian and Mestizo Populations, Human Biology, Volume 75, Number 1.

Ki Wha Chung, Ki Min Seong, a Population genetics of insertion–deletion polymorphisms in South Koreans using Investigator DIPplex® kit, Forensic Science International: Genetics (2014) pag 80–83

Koblinsky Lawrence., DNA Forensic and legal Applications, Wiley – Interscience, 2005, pág 166-169.

Korabecna M, Zidkova A, Horinek A, Kebrdlova V; 2013 Application of the new insertion–deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech population, Int J Legal Med, 127:7–10 DOI 10.1007/s00414-011-0649-3.

LaRue B., Ge j., King J., Budowle B., 2012, A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex® kit; an INDEL-based assay for human identification. Int J Legal Med. 126:533–540.

Landaburu J. (1988), "Clasificación de las lenguas indígenas de Colombia" Editorial Cada. Alemania. 1995, P 119

Lorente J.A., Lorente M. El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica. Editorial Comares. Granada, España. 1995, P 16 - 19.

Ludes B, Hollard C, Mendisco F, Keyser C, Crube'z E. 2011, First application of the Investigator DIPplex indels typing kit for the analysis of ancient DNA samples, Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3 e393–e394.

M. Krawczak, Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms, Electrophoresis 20 (1999) 1676–1681.

Manta F., Caiafa A., Pereira R., Amorim A., Carvalho E., Gusma'õ L., 2012, InDel markers: genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations and application in a paternity investigation with post mortem material, Forensic Sci. Int. Genet. 6 658–661.

Martínez B., Caraballo I., Barón F., Gusmao L., Amorim A., Carracedo a. 2005. Analysis of STR loci in Cartagena, a Caribbean city of Colombia. Forensic Science International-Genetics.

Mills R., Lutting C., Devine S., An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. 2006, Genome Res16: 1182-90.

Milós,A. Selmanovic,L. Smajlovic,R. Huel,C. Katzmarzyk,A. Rizvic Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements Croat Med J, 48 (2007), pp. 486-493.

Morling N, Susanne Lunøe Friis (2012) Typing of 30 insertion/deletions in Danes using the first commercial indel kit—Mentype1 DIPplex®, Forensic Science International: Genetics 6 e72–e74.

Moroni R., Gasbarra D., Arjas E., Lukka M., Ulmanen I. 2008. Effects of reference population and number of STR markers on paternity testing. Forensic Science International-Genetics. Supplement Series 10:102 p.

Musgrave,. 2007. Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay., *Forensic Sci Int Genet.*; 1; 186-90.

Olarte S., Fuentes A., Cárdenas H., Barreto G. 2010. Diversidad Y Estructura Genética de Tres poblaciones Afrodescendientes del Suroccidente Colombiano a partir de 8 STR's. *Acta biológica Colombiana.* vol.15 no.2.

Osiewacz HD., Hermanns J. 1992. The role of mitochondrial DNA rearrangements in aging and human diseases. *Aging Clin Exp Res.* 275:249-255.

Oslender, Ulrich, *Comunidades negras y espacio en el Pacífico colombiano*, Bogotá: ICAN, 2008

Pagano S, Saiz, André, Pisano, Sandberg B., Allelic frequencies and statistical data from 30 INDEL loci in Uruguayan population, *Forensic Science International: Genetics* Volume 9, March 2014, Pages e27-e29.

Paredes M, Galindo A, Bernal M, Avila S, Andrade D, Vergara C et al. 2003. Analysis of the CODIS autosomal STR loci in four main Colombian regions. *Forensic Science International-Genetics* 137:67-73 p.

Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmaõ L, 2009, A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms, *Electrophoresis*, 30, 3682–3690

Pierce Benjamín A, *Genética un enfoque conceptual*, 2ª edición, Panamericana, 2006, pág 305.

Pissoat O. y Gouëset V., La representación cartográfica de la violencia en las ciencias sociales colombianas , *Revista Cahiers des Amériques Latine.* No. 37, febrero de 2002.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, Inference of population structure using multilocus genotype data, (2000). *Genetics* 155: 945–959

Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. 1995; *J. Heredity*, 86:248-249.

Ramos J. Misión rural, una perspectiva regional: informe final. Volumen 9. 1998. ICCA TM Editores. P 27.

Rey m., Gutiérrez A., Schroedera B., Usaquén W., Carracedo A., Bustos I., Giraldo A. 2003. Allele frequencies for 13 STR's from two Colombian populations: Bogota and Boyaca. *Forensic Science International-Genetics* 136:83-85 p.

Romero, Mario Diego. 1995. Poblamiento y Sociedad en el Pacífico colombiano siglos XVI al XVIII. Cali: Editorial Facultad de Humanidades, Universidad del Valle.

Rondón F, Osorio J, Peña A, Garcés G, 2008, Diversidad genética en poblaciones humanas de dos regiones colombianas, *Revista Colombia Médica*, Vol 39, No 2 Supl 2

Rosenberg NA (2005) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4: 137–138.

Sajantila A, Neuvonen A, U. Palo, Hedman M, 2012, Discrimination power of Investigator DIPplex loci in Finnish and Somali populations, *Forensic Science International: Genetics* 6 e99–e102.

Simms R., Wright M., Martinez E., Regueiro M., McCartney Q., Herrera T., 2013, Y-STR diversity and sex-biased gene flow among Caribbean populations, *Forensic Sci. Int*, Volume 516, Issue 1, 1, Pages 82–92.

Swango, K. L., Timken, M. D., Chong, M. D., & Buoncristiani, M. R. (2006). A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic science international*, 158(1), 14-26.

Tarazona-Santos, E., Carvalho-Silva, D. R., Pettener, D., Luiselli, D., De Stefano, G. F., Labarga, C. M., Santos, F. R. (2001). Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. *The American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1485-1496.

Tereba A. 1999 Tools for analysis of population statistics, profiles in DNA. Promega Corporation 2:14–6 p.

Torres C, Urbano L, Portilla E., Builes J, Gusmão L, 2016, Composición genética ancestral de una población humana del sudoeste de Colombia usando AIM-InDels autosómicos; BAG, J. basic appl. genet. vol.27 no.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Turrina S., Filippini G., De Leo., 2011, Forensic evaluation of the Investigator DIPplex® typing system, *Forensic Sci. Int. Genet.* e331–e332

Ülo Väli., Mikael Brandström., Malin Johansson., Hans Ellegren. 2008. Insertion-deletion polymorphisms (INDELS) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics*. 2156: 9-8.

Uribe Margarita, Ernesto Rojas Morales, op,cit y DANE Censo General 2005, COLOMBIA UNA NACIÓN MULTICULTURAL Su diversidad étnica, DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA DANE, 2007.

Usaquén W., Alonso L., 2013, Y-chromosome and surname analysis of the native islanders of San Andrés and Providencia (Colombia), *HOMO - Journal of Comparative Human Biology*, Volume 64, Issue 1, Pages 71–84.

Vallone M. Fondevila., Phillips M., Santos C., Pereira R., Gusmão L., Carracedo A., Butler J. M., Lareu M. V., 2011, Forensic performance of two insertion–deletion marker assays International Forensic Journal of Legal Medicine, Volume 126, Issue 5, pp 725–737.

Vargas C., Castillo A., Gil A., Pico A., Garcia O. 2003. Population genetic data for 13 STR loci in a northeast Colombian (department of Santander) Population. International Congress Series1293:197-200 p.

Vieira C., Matosa S., Afonso H., Moraisa P., Marques dos Santos R., Amorim A., 2013, Genetic portrait of south Portugal population with InDel markers, Forensic Sci Int Genet, e101-e103.

Wang, S., Ray, N., Rojas, W., Parra, M. V., Bedoya, G., Gallo, C., . . . Hurtado, A. M. (2008). Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS genetics*, 4(3)

Weber JL., May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 44:388-396

Weber, J. L., David, D., Heil, J., Fan, Y., Zhao, C., Marth, G.,. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 71, 854–862

Wei Y., Qin C., Dong H., Jia J., Li C., 2014, A validation study of a multiplex INDEL assay for forensic use in four Chinese populations, *Forensic Sci Int Genet*, e22-e25.

Weir B. y Cockerham C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6): 1358-1370.

Wyman AL., White Ph. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 77:6754-6758.

Zhang, ZhuLi-P., YanBo-F., Ting M., Chun-Mei, ShenYao-S., LiuHao-T., MengYu-D., ZhangYu-X., GuoQ., DongXin-X., WangJiang-W., 2016, SpringerPlus, Population genetic structure analysis and forensic evaluation of Xinjiang Uigur ethnic group on genomic deletion and insertion polymorphisms.

Zidkova A., Horinek A., Kebrdlova V., Korabecna M., 2013, Int J Legal Med, Application of the new insertion–deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech population, 127:7-10.