



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Uso del Polietilen Glicol (PEG) en la fijación de tejidos
blandos preservados en bloques de parafina y su
aplicación forense en las áreas de genética y patología

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Carolina León Campos



DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Gen. Mauro López Armenta

Ciudad Universitaria, CDMX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

León
Campos
Carolina
55 29 62 62 79
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
309161572

2. Datos del tutor

M. en C. Gen.
Mauro
López
Armenta

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Rivas
Manzano

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Horacio Valdemar
Bárceñas
Rodríguez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández

6. Datos del sinodal 4

Biól.
María Eugenia
Ambriz
Franco Romero

7. Datos del trabajo escrito

Uso del Polietilen Glicol (PEG)
en la fijación de tejidos blandos
preservados en bloques de parafina
y su aplicación forense en las áreas
de genética y patología
125 p
2016

DEDICATORIA

Para ustedes, mi motor e inspiración de todos los días.

*A ti **mamá** que me has enseñado a ser fuerte y a tener el carácter que me ha permitido alcanzar mis metas.*

*A ti **papá** que me recuerdas nunca perder el piso, que me has enseñado a tener la suficiente humildad para llegar a ser una buena persona.*

*A mi abuelita **Rebeca** que me ha enseñado que mientras se tenga fortaleza y ganas, los límites no existen.*

*A mi abuelita **Eva** que sé que donde quiera que estés, estarías orgullosa de saber que lo logré.*

AGRADECIMIENTOS

Me resulta imposible pensar en todas las personas que me han ayudado a alcanzar una meta que hoy se vuelve realidad: obtener mi título. Son muchas personas las que han contribuido en mi persona y en mi formación académica de una u otra manera y, sin importar si se encuentran o no mencionadas a continuación, siempre les estaré agradecida por haberme brindado su ayuda en algún punto del camino.

Agradezco infinitamente al M. en C. Mauro López Armenta que más allá de haber sido mi tutor, es mi amigo y mi ejemplo. No encuentro ni encontraré las palabras para agradecerte lo mucho que me has enseñado y apoyado, no sólo en cuestión de genética forense sino en todos los aspectos de esta vida. Eres una gran persona que admiro por la sencillez y sensatez que tienes, por siempre compartir tus conocimientos y tu persona misma. Gracias por toda la confianza que has depositado en mí, porque eso para mí vale más que oro puro.

Mil gracias a la Biol. Ma. Eugenia Ambriz Franco Romero que además de ser la mejor "jefecita" eres una persona maravillosa. Maru te agradezco lo mucho que me has apoyado desde un inicio, por haberme enseñado a trabajar en un laboratorio de genética forense, por brindarme tu amistad y muchos buenos consejos, por ayudarme a ver esos detalles que siempre pasaba por alto y por esas pláticas que siempre amenizaban mis días en el laboratorio.

De igual manera agradezco a los miembros del Laboratorio de genética del INCIFO a la M. en C. Mariana Ruiz, a la Biol. Yadira López y al T.Q.I. Raúl Flores porque de una u otra manera ustedes siempre tuvieron la mejor disposición en compartir su experiencia, consejos y anécdotas conmigo, los cuales siempre me permitieron aprender algo nuevo.

Gracias a los histopatólogos Francisco J. Alvarado Martínez y Fernando Vázquez Reséndiz, así como al patólogo Roberto C. Mendoza Morales del Laboratorio de Patología del INCIFO, porque fueron ustedes quienes me enseñaron a procesar e interpretar las muestras desde un punto de vista histopatológico, gracias por toda su ayuda y por la buena disposición que siempre tuvieron conmigo. También le debo un gran agradecimiento al técnico Julio César Salazar, quien fue el que con su trabajo de plastinación de órganos nos dio la pauta para llevar a cabo el presente trabajo.

Gracias a mis profesoras de histología y revisoras de tesis la Dra. Patricia Rivas Manzano y la Dra. Rosario Ortiz Hernández por tomarse el tiempo de leer mi trabajo e infinitas gracias por dar con tanto detalle su materia, la cual no negare que es complicada en su momento, pero al final es un esfuerzo que tiene una recompensa posterior.

Gracias a mi gran profesor de genética el M. en C. Horacio Valdemar Bárcenas Rodríguez, por la paciencia con la que recuerdo da sus clases, la honestidad en cada una de sus correcciones y comentarios, por su profesionalismo y ese impulso que permite a estudiantes como yo seguir su camino académico.

No puedo dejar de agradecer todo el apoyo que he recibido a lo largo de años por parte de la familia que elegí: mis amigos. Zaida Martínez porque no importa el momento ni la circunstancia siempre tienes una hermosa sonrisa que mostrarme, Kevin Morales por enseñarme que aun siendo adultos todos tenemos alma de niño, Fernanda Real porque fue gracias a ti que conocí el mundo forense, Andrés Mejía por siempre contagiarme de un entusiasmo maravilloso, Biaanni Velasco por siempre

estar en los momentos en que lo necesitaba y brindarme un buen consejo, David Avilés por haber sido mi fiel compañero de batallas en la Facultad, Ameyalli García por ser una de las personas más lindas que he tenido el placer de conocer, Jimmy Hernández por ser tan "Jimmy" y brindarme el mejor apoyo estadístico que podría pedir, Valeria Rangel por ser una de las personas más dulces y porque me has demostrado tener un corazón enorme, Andrés Mendoza por ayudarme a crecer y ser mejor persona, porque sólo tú sabes lo mucho que significas para mí, lo mucho que agradezco tu apoyo incondicional en las buenas y sobretodo en las malas, Ariadna Maya porque siempre serás mi pequeña hermanita con la que quiero compartir experiencias y Martí Medina porque siempre que necesito un respiro estas ahí para mí.

Mi más grande agradecimiento es para mi querida familia, pues son ustedes quienes me han cuidado y procurado en todo momento, pero sobre todo son quienes me han apoyado en cada pequeño paso que he dado. A mis papás Carolina y Jesús, a quienes nunca terminaré de agradecer todo lo que han hecho por mí, por ayudarme a crecer y por enseñarme a ser mejor cada día. Porque lo que soy y lo que he logrado es gracias a su infinito amor, gracias por todas sus enseñanzas, que espero algún día me permitan ser la mejor versión de cada uno de ustedes. A mi hermano Aquileo, porque siempre has estado ahí y a tu manera siempre me proteges como el hermano mayor que eres y porque es contigo con quien siempre puedo reír a carcajadas.

Gracias a mi abuelita Rebeca por siempre consentirme y apoyarme de todas las formas posibles, a mis tías Sonia y Norma quienes desde que tengo uso de razón han sido como mis segundas madres, gracias por siempre estar ahí para mí. A mis tíos Alejandro, Fernando y Jaime por siempre ayudarme en todo lo que respecta a sus áreas de conocimiento.

Finalmente agradezco a mi casa de estudios: mi amada UNAM. Por darme la oportunidad de formarme académicamente como profesionista siendo parte de tu comunidad. Es un orgullo pertenecer a la mejor Universidad de México.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

“La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, y quizás, algún día, un descubrimiento científico como el radio, puede llegar a beneficiar toda la humanidad”

Marie Curie

“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter”

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
DETERMINACIÓN DE LAS CAUSAS DE MUERTE	2
IDENTIFICACIÓN HUMANA	2
MARCO TEÓRICO	4
PATOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA FORENSE	4
<i>Tipo de muestras y su preservación</i>	4
Alternativas metodológicas en los bloques parafinados	5
<i>Proceso histológico</i>	6
Fijación tisular	7
Fijación física	7
Fijación química	8
Deshidratación y diafanización	11
Inclusión en medio sólido.....	11
Inclusión en parafina	12
Microtomía	12
Extensión y adhesión.....	13
Desparafinado e hidratación.....	13
Tinción histológica	14
Tipos de colorantes.....	14
Tipos de tinción.....	15
Tinciones histológicas.....	16
Montaje.....	18
Microscopia.....	18
Microscopio óptico	18
GENÉTICA FORENSE	20
<i>ADN, la molécula de la vida</i>	21
Marcadores genéticos	23
Repeticiones cortas en tándem (STRs)	24
Marcadores alternativos a los STRs	25
<i>Tipos de muestras y su preservación</i>	27
<i>Análisis del ADN</i>	28
Métodos de extracción de ADN	28
Cuantificación de ADN	30
Amplificación de ADN.....	33
Genotipificación del ADN	35
PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	39
<i>Prueba de Kruskal-Wallis</i>	40
<i>Prueba Post Hoc</i>	41
JUSTIFICACIÓN	42
OBJETIVOS	43
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS PARTICULARES	43
MATERIAL Y MÉTODO	44
TOMA DE MUESTRA	44
PROCESO HISTOLÓGICO	45

<i>Fijación de tejidos</i>	45
<i>Deshidratación e inclusión de los tejidos en bloques de parafina</i>	45
<i>Tinciones histológicas</i>	46
ANÁLISIS DEL ADN	47
<i>Extracción y purificación de ADN</i>	47
<i>Cuantificación de ADN (PCR Tiempo Real)</i>	48
<i>Amplificación de ADN (PCR Multiplex)</i>	49
<i>Electroforesis capilar</i>	49
<i>Análisis estadístico</i>	49
RESULTADOS	50
ESTANDARIZACIÓN.....	50
<i>Tiempo óptimo de fijación del tejido</i>	50
<i>Degradación del ADN durante la fijación</i>	51
HISTOPATOLOGÍA.....	56
<i>Conservación histológica</i>	56
<i>Calidad de las tinciones histológicas</i>	56
GENÉTICA.....	61
<i>Cuantificación de ADN (Cantidad de ADN)</i>	61
<i>Análisis estadístico</i>	64
<i>Electroforesis capilar (Calidad del ADN)</i>	65
DISCUSIÓN	73
ESTANDARIZACIÓN.....	73
<i>Tiempo óptimo de fijación del tejido</i>	73
<i>Degradación del ADN durante la fijación</i>	73
HISTOPATOLOGÍA.....	74
<i>Conservación histológica</i>	74
<i>Calidad de las tinciones</i>	75
GENÉTICA.....	77
<i>Cantidad de ADN</i>	77
<i>Calidad de ADN</i>	78
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
REFERENCIAS	82
ANEXOS	86
ANEXO I. TINCIONES HISTOLÓGICAS.....	86
ANEXO II. PERFILES GENÉTICOS DE REFERENCIA.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

FIGURA 1. COMPONENTES BÁSICOS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS. ESQUELETO DEL FOSFATO (AZUL), EL AZÚCAR (ROJO) Y LAS BASES NITROGENADAS (VERDE) QUE SE UNEN AL AZÚCAR. SE MUESTRA COMO LA POSICIÓN DE LOS FOSFATOS Y EL AZÚCAR DETERMINAN EL SENTIDO DE LA CADENA-(TOMADO Y MODIFICADO DE BUTTLER, 2009).	21
FIGURA 2. APAREAMIENTO DE LAS BASES EN LAS CADENAS DE ADN PARA FORMAR LA ESTRUCTURA DE DOBLE HÉLICE. UNIÓN DE LAS BASES NITROGENADAS BAJO EL PRINCIPIO DE COMPLEMENTARIEDAD- (TOMADO Y MODIFICADO DE BUTTLER, 2009).	22
FIGURA 3. TIPOS DE ADN ANIMAL. SE EJEMPLIFICA LA ESTRUCTURA Y NIVELES DE COMPACTACIÓN DEL ADN NUCLEAR, LA ESTRUCTURA DEL ADN MITOCONDRIAL, ASÍ COMO SU LOCALIZACIÓN EN LA CÉLULA PARA AMBOS CASOS.....	23
FIGURA 4. MARCADORES DEL KIT POWER PLEX FUSION SYSTEM. SE MUESTRAN LOS MARCADORES QUE CONTIENE EL KIT DE IDENTIFICACIÓN PP-F, LOS TAMAÑOS MAYORES Y MENORES DE CADA UNO DE ELLOS, ASÍ COMO LOS POSIBLES ALELOS PARA CADA MARCADOR (TOMADO Y MODIFICADO DE PROMEGA, 2016).	25
FIGURA 5. FUNDAMENTO DEL FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTÓMETRO. LA LUZ UV ES EMITIDA POR UNA LÁMPARA QUE A TRAVÉS DE UN CONDENSADOR DIRIGE LOS RAYOS HACIA LA MUESTRA, UBICADA DENTRO DE UNA CELDA DE CUARZO. LA LUZ SERÁ ABSORBIDA DE MANERA PROPORCIONAL DE ACUERDO A LA CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA. LA LUZ QUE NO ES ABSORBIDA POR LA MUESTRA ES MEDIDA POR EL DETECTOR, RESTÁNDOLA A LA LUZ INICIAL EMITIDA, GENERANDO ASÍ UNA LECTURA EN UNIDADES DE ABSORBANCIA QUE OSCILA ENTRE 0.001 A 1.000 (TOMADO DE SALAZAR ET AL., 2011).....	31
FIGURA 6. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS. REPRESENTACIÓN DE UN GEL DE AGAROSA EN EL CUAL SE VISUALIZA UN MARCADOR DE PESO MOLECULAR JUNTO A LAS MUESTRAS PARA AYUDAR EN LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DE LOS FRAGMENTOS. LA MUESTRA ES CARGADA EN LOS POCILLOS Y SE DEJA CORRER HACIA EL POLO POSITIVO (TOMADO DE SALAZAR ET AL., 2011).	32
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN DEL ENSAYO POR SONDAS TAQMAN. SE MUESTRA EL FUNDAMENTO DE LAS SONDAS TAQMAN UTILIZADAS EN LA CUANTIFICACIÓN POR PCR TIEMPO REAL (TOMADO Y MODIFICADO DE BUTTLER, 2009).	33
FIGURA 8. FUNCIONAMIENTO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR. SE ESQUEMATIZAN LOS PASOS EN LA EC, DESDE LA INYECCIÓN DE LA MUESTRA EN EL CAPILAR, LA SEPARACIÓN DE LAS MOLÉCULAS, LA LECTURA POR EL LÁSER, LA DETECCIÓN POR LA CÁMARA, ASÍ COMO LA INTERPRETACIÓN DE LAS MUESTRAS (TOMADO Y MODIFICADO DE BUTTLER, 2011).....	37
FIGURA 9. SECUENCIACIÓN SANGER AUTOMATIZADA. SE ESQUEMATIZAN LOS PASOS DE LA SECUENCIACIÓN SANGER, DESDE EL MARCAJE DEL ADN EN PCR, HASTA EL ANÁLISIS EN ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA GENÉTICA (TOMADO Y MODIFICADO DE SUGGEST-KEYWORDS.COM).	38
FIGURA 10. MÚSCULO OBLICUO EXTERNO. FRAGMENTO TOTAL DE MÚSCULO SIN GRASA QUE SE TOMÓ DEL CADÁVER 1 (IZQ.) Y FRAGMENTO QUE FUE PUESTO EN ALGÚN TRATAMIENTO DE FIJACIÓN (DER.).....	44
FIGURA 11. FRAGMENTOS DE ENCÉFALO. SE MUESTRAN DOS FRAGMENTOS DE ENCÉFALO LISTOS PARA EL PROCESO DE FIJACIÓN.....	44
FIGURA 12. TEJIDOS EN FIJACIÓN. SE OBSERVA UNA MUESTRA DE TEJIDO MUSCULAR EN LOS DOS TRATAMIENTOS DE FIJACIÓN TRATAMIENTO 2 (IZQ.) Y TRATAMIENTO 1 (DER.) TIEMPO DE FIJACIÓN 00 HORAS.....	45
FIGURA 13. 50 MG DE TEJIDO MUSCULAR. SE MUESTRA EL FRAGMENTO DE TEJIDO FRESCO QUE SE TOMÓ PARA REALIZAR LA EXTRACCIÓN DE ADN.	47
FIGURA 14. FIJACIÓN DE LOS TEJIDOS DE ACUERDO A SU COLORACIÓN. SE MUESTRA LA COMPARACIÓN EN LA FIJACIÓN DE TEJIDO MUSCULAR A DISTINTAS HORAS: A FIJACIÓN A LAS 6 HORAS: T2 PEG (IZQ) Y T1 FORMOL (DER). B FIJACIÓN A LAS 24 HORAS: T2 PEG (IZQ) Y T1 FORMOL (DER).....	50
FIGURA 15. FIJACIÓN DEL TEJIDO DE ACUERDO A SU CONSERVACIÓN HISTOLÓGICA. SE MUESTRAN LOS CORTES HISTOLÓGICOS DE TEJIDO MUSCULAR FIJADOS A DISTINTOS TIEMPOS Y TRATAMIENTOS. A FIJACIÓN A LAS 6 HORAS T1, B FIJACIÓN A LAS 6 HORAS T2, C FIJACIÓN A LAS 24 HORAS T1 Y D FIJACIÓN A LAS 24 HORAS T2. EN TODAS LAS PREPARACIONES SE OBSERVAN FIBRAS MUSCULARES EN CORTE TRANSVERSAL (Fm) Y NÚCLEOS CELULARES (N) (40x).	50
FIGURA 16. CALIDAD DEL ADN A LAS 24 HORAS DE FIJACIÓN. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO DEL CADÁVER 1 FIJADOS EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) DURANTE 24 HORAS. SE OBSERVA UNA GRAN DEGRADACIÓN DEL ADN EN LA MUESTRA FIJADA CON FORMOL TENIENDO UNA RECUPERACIÓN DE SÓLO 8 MARCADORES DE LOS 24 DEL KIT PP-F (NO SE CONSIDERA EL MARCADOR D1S1656 PORQUE FALTA LA DETECCIÓN DE UN ALELO, VER PERFIL DE REFERENCIA ANEXO II), MIENTRAS QUE EN LA MUESTRA FIJADA CON PEG A PESAR DE HABER DEGRADACIÓN DEL ADN HUBO UNA RECUPERACIÓN DE 23 MARCADORES.	53
FIGURA 17. CALIDAD DEL ADN A LOS 5 DÍAS DE FIJACIÓN. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO DEL CADÁVER 1 FIJADOS EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) DURANTE 5 DÍAS. SE OBSERVA UNA GRAN DEGRADACIÓN DEL ADN EN LA	

MUESTRA FIJADA CON FORMOL TENIENDO UNA RECUPERACIÓN DE SÓLO 7 MARCADORES DE LOS 24 DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE EN LA MUESTRA FIJADA CON PEG A PRESENTA MENOR DEGRADACIÓN PERMITIENDO LA RECUPERACIÓN DE 20 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F.	54
FIGURA 18. CALIDAD DEL ADN A LOS 15 DÍAS DE FIJACIÓN. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO DEL CADÁVER 1 FIJADOS EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) DURANTE 15 DÍAS. SE OBSERVA LA DEGRADACIÓN TOTAL DEL ADN EN LA MUESTRA FIJADA CON FORMOL TENIENDO UNA NULA DETECCIÓN DE LOS MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE EN LA MUESTRA FIJADA CON PEG LA DEGRADACIÓN ES MENOR PERMITIENDO UNA RECUPERACIÓN DE 7 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F (NO SE CONSIDERA EL MARCADOR D12S391 PORQUE FALTA LA DETECCIÓN DE UN ALELO, VER PERFIL DE REFERENCIA ANEXO II).....	55
FIGURA 19. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (HE). COMPARACIÓN DE LA TINCIÓN HE EN PULMÓN EN AMBOS TRATAMIENTOS FIJADORES: A T1 (FORMOL) Y B T2 (PEG). CORTES DE PULMÓN EN DONDE SE APRECIA: ALVEOLO PULMONAR (A), BRONQUIOLO (B), EPITELIO ALVEOLAR (E). DEBIDO A QUE EL PULMON PRESENTABA EDEMA SE APRECIAN MACRÓFAGOS (M) Y ERITROCITOS (E) EN LOS ALVEOLOS (40x).	57
FIGURA 20. TINCIÓN DE SCHIFF (PAS). COMPARACIÓN DE LA TINCIÓN PAS EN ENCÉFALO EN AMBOS TRATAMIENTOS FIJADORES: A T1 (FORMOL) Y B T2 (PEG). CORTES DE SUSTANCIA BLANCA EN DONDE SE APRECIAN LOS NÚCLEOS DE LOS OLIGODENDROCITOS (FLECHAS) TEÑIDOS EN MORADO Y ARTERIOLAS CON LA MEMBRANA BASAL TEÑIDA DE PURPURA (MB) (40x).	57
FIGURA 21. TINCIÓN ZIEHL-NELSEN (ZN). COMPARACIÓN DE LA TINCIÓN ZN EN RIÑÓN EN AMBOS TRATAMIENTOS FIJADORES: A T1 (FORMOL) Y B T2 (PEG). CORTES DE RIÑÓN EN DONDE SE APRECIAN LOS NUCLEOS CELULARES, ASÍ COMO DE LAS CÉLULAS QUE CONFORMAN LOS TÚBULOS CONTORNEADOS PROXIMALES Y DISTALES TEÑIDOS EN AZUL Y LOS ERITROCITOS (E) QUE SE ENCUENTRAN EN LOS CAPILARES EN ROJO. TINCIÓN NEGATIVA PARA LAS BAAR Y EL BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x).	57
FIGURA 22. TRICRÓMICA DE MASSON. COMPARACIÓN DE LA TINCIÓN DE MASSON EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN AMBOS TRATAMIENTOS FIJADORES: A TRATAMIENTO 1 (FORMOL) Y B TRATAMIENTO 2 (PEG). CORTES DE MÚSCULO ESTRIADO EN DONDE SE MUESTRAN LAS FIBRAS MUSCULARES (FM) EN CORTE TRANSVERSAL TEÑIDAS EN ROSA Y EN AZUL LA COLAGENA MADURA (CM) (40x).	58
FIGURA 23. TINCIÓN GRAM. COMPARACIÓN DE LA TINCIÓN GRAM EN HÍGADO EN AMBOS TRATAMIENTOS FIJADORES: A T1 (FORMOL) Y B T2 (PEG). CORTE DE HÍGADO DÓNDE SE APRECIAN LOS HEPATOCITOS (H) FORMANDO CORDONES, VASOS SINUSOIDES (VS) INTERCALADOS ENTRE LOS CORDONES HEPÁTICOS, ASÍ COMO TAMBIÉN SE APRECIAN LAS ÁREAS PORTALES. SE TIÑEN DE ROJO TODAS LAS ESTRUCTURAS CELULARES (NUCLEO Y CITOPLASMA) CON MAYOR O MENOR INTENSIDAD. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	58
FIGURA 24. GRÁFICAS CUANTIL-CUANTIL (Q-Q) DE NORMALIDAD. SE MUESTRAN LAS GRÁFICAS DE NORMALIDAD PARA LOS GRUPOS: TEJIDO FRESCO (IZQUIERDA), T1 (FORMOL) (CENTRO) Y T2 (PEG) (DERECHA).....	64
FIGURA 25. CALIDAD DEL ADN DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO PULMONAR DEL CADÁVER 2 FIJADO EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) E INCLUIDOS EN BLOQUES DE PARAFINA. SE OBSERVA QUE LA FIJACIÓN CON FORMOL DEGRADÓ EL ADN DE ALTO PESO MOLECULAR (>420 PB) IMPOSIBILITANDO LA DETECCIÓN DE 2 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE LA FIJACIÓN CON PEG NO DEGRADÓ EL ADN PERMITIENDO LA DETECCIÓN DE TODOS LOS MARCADORES DEL KIT PP-F.	67
FIGURA 26. CALIDAD DEL ADN DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO MUSCULAR DEL CADÁVER 3 FIJADO EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) E INCLUIDOS EN BLOQUES DE PARAFINA. SE OBSERVA QUE LA FIJACIÓN CON FORMOL DEGRADÓ EL ADN DE ALTO PESO MOLECULAR (>420 PB) IMPOSIBILITANDO LA DETECCIÓN DE 1 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE LA FIJACIÓN CON PEG NO DEGRADÓ EL ADN PERMITIENDO LA DETECCIÓN DE TODOS LOS MARCADORES DEL KIT PP-F.	68
FIGURA 27. CALIDAD DEL ADN DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO PULMONAR DEL CADÁVER 4 FIJADO EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) E INCLUIDOS EN BLOQUES DE PARAFINA. SE OBSERVA QUE LA FIJACIÓN CON FORMOL DEGRADÓ EL ADN DE ALTO PESO MOLECULAR (>420 PB) IMPOSIBILITANDO LA DETECCIÓN DE 2 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE LA FIJACIÓN CON PEG NO DEGRADÓ EL ADN PERMITIENDO LA DETECCIÓN DE TODOS LOS MARCADORES DEL KIT PP-F.	69
FIGURA 28. CALIDAD DEL ADN DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO HEPÁTICO DEL CADÁVER 5 FIJADO EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) E INCLUIDOS EN BLOQUES DE PARAFINA. SE OBSERVA QUE LA FIJACIÓN CON FORMOL DEGRADÓ EL ADN DE ALTO PESO MOLECULAR (>420 PB) IMPOSIBILITANDO LA DETECCIÓN DE 2 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE LA FIJACIÓN CON PEG NO DEGRADÓ EL ADN PERMITIENDO LA DETECCIÓN DE TODOS LOS MARCADORES DEL KIT PP-F.	70
FIGURA 29. CALIDAD DEL ADN DE PÁNCREAS INCLUIDO EN PARAFINA. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO PANCREÁTICO DEL CADÁVER 2 FIJADO EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) E INCLUIDOS EN BLOQUES DE PARAFINA. SE OBSERVA QUE LA FIJACIÓN CON FORMOL DEGRADÓ EL ADN DE ALTO PESO MOLECULAR (>420 PB) IMPOSIBILITANDO LA DETECCIÓN DE 1 DE LOS 24 MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE LA FIJACIÓN CON PEG NO DEGRADÓ EL ADN PERMITIENDO LA DETECCIÓN DE TODOS LOS MARCADORES DEL KIT PP-F.	71

FIGURA 30. CALIDAD DEL ADN DEL PÁNCREAS EN PARAFINA. SE MUESTRAN LOS ELECTROFEROGRAMAS CORRESPONDIENTES AL TEJIDO PANCREÁTICO DEL CADÁVER 5 FIJADO EN FORMOL (IZQUIERDA) Y EN PEG (DERECHA) E INCLUIDOS EN BLOQUES DE PARAFINA. SE OBSERVA QUE LA FIJACIÓN CON FORMOL DEGRADÓ EL ADN, SIN EMBARGO, PERMITIÓ LA DETECCIÓN DE TODOS LOS MARCADORES DEL KIT PP-F, MIENTRAS QUE LA FIJACIÓN CON PEG DEGRADÓ EN MAYOR MEDIDA EL ADN DE 2 MARCADORES DE 24 DE ALTO PESO MOLECULAR (>354.5 pb) DEL KIT PP-F. 72

ANEXO I

- FIGURA 31. ENCÉFALO T1 HE.** CORTE DE ENCÉFALO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN NEURONAS (FLECHAS) CON NÚCLEOS BIEN DEFINIDOS, PERO CON UNA GRAN RETRACCIÓN CELULAR EN TODAS ELLAS (40x). 86
- FIGURA 32. ENCÉFALO T2 HE.** CORTE DE ENCÉFALO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN NEURONAS (FLECHAS) CON NÚCLEOS POCO DEFINIDOS. LAS NEURONAS PRESENTAN MUY POCAS O NULAS RETRACCIONES CELULARES (40x)..... 86
- FIGURA 33. PÁNCREAS T1 HE.** CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE LOS ACINOS PANCREÁTICOS (AP) CON SUS NÚCLEOS CELULARES BIEN DEFINIDOS. EN LA PARTE INFERIOR IZQUIERDA SE OBSERVA TEJIDO CONJUNTIVO (TC) (40x). 87
- FIGURA 34. PÁNCREAS T2 HE.** CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO DE LOS ACINOS PANCREÁTICOS (AP) TEÑIDOS EN MORADO, PERO EL DETALLE CELULAR Y NUCLEAR DE CADA UNO DE ELLOS SE PERDIÓ DEBIDO A UNA MALA FIJACIÓN (40x)..... 87
- FIGURA 35. HÍGADO T1 HE.** CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE UNA TRIADA HEPÁTICA (VENA PORTA (VP), ARTERIA (A) Y CONDUCTOS BILIARES (CB)) RODEADO DE HEPATOCITOS (H) DISPUESTOS EN CORDONES. LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN (40x)..... 88
- FIGURA 36. HÍGADO T2 HE.** CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO DE UNA TRIADA HEPÁTICA (VENA PORTA (VP), ARTERIA (A) Y CONDUCTOS BILIARES (CB)) RODEADO DE HEPATOCITOS (H) DISPUESTOS EN CORDONES. LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN (40x)..... 88
- FIGURA 37. RIÑÓN T1 HE.** CORTE DE RIÑÓN FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE UN CORPÚSCULO RENAL (CR), TÚBULOS CONTORNEADO PROXIMALES (TP) Y DISTALES (TD) Y VASOS SANGUÍNEOS CON ERITROCITOS (FLECHAS). LOS NÚCLEOS CELULARES DE LOS PODOCITOS Y DE LAS CÉLULAS DE LOS TÚBULOS CONTORNEADOS SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN (40x)..... 89
- FIGURA 38. RIÑÓN T2 HE.** CORTE DE RIÑÓN FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO DE UN CORPÚSCULO RENAL (CR), TÚBULOS CONTORNEADO PROXIMALES (TP) Y DISTALES (TD). LOS NÚCLEOS CELULARES DE LOS PODOCITOS Y DE LAS CÉLULAS DE LOS TÚBULOS CONTORNEADOS SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN (40x). 89
- FIGURA 39. PÁNCREAS T1 PAS.** CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T1 (FORMOL), EL ARREGLO DE LOS ACINOS PANCREÁTICOS (AP) NO SE ENCUENTRA BIEN DEFINIDO, SIN EMBARGO, LA DIFERENCIACIÓN DE SUS NÚCLEOS CELULARES ES POSIBLE GRACIAS A LA TINCIÓN. EN LA PARTE SUPERIOR IZQUIERDA SE OBSERVA TEJIDO CONJUNTIVO (TC) (40x). 90
- FIGURA 40. PÁNCREAS T2 PAS.** CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T2 (PEG), LAS CELULAS ACINARES (CA) PERDIERON EL ARREGLO EN ACINOS PANCREÁTICOS, ASÍ COMO TAMPOCO SE APRECIA EL DETALLE NUCLEAR DE CADA CÉLULA, DEBIDO A UNA MALA FIJACIÓN DEL TEJIDO (40x). . 90
- FIGURA 41. MÚSCULO T1 PAS.** CORTE DE MÚSCULO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN FIBRAS MUSCULARES (FM) EN CORTE LONGITUDINAL, SE DESTACA LA TINCIÓN EN PURPURA DE LA MEMBRANA BASAL (FLECHA) DE UNA ARTERIA RODEADA DE TEJIDO CONJUNTIVO (TC). LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN TEÑIDOS DE MORADO-AZUL (40x). 91
- FIGURA 42. MÚSCULO T2 PAS.** CORTE DE MÚSCULO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN FIBRAS MUSCULARES (FM) EN CORTE LONGITUDINAL, SE DESTACA LA TINCIÓN EN PURPURA DE LA MEMBRANA BASAL (FLECHA) DE UNA ARTERIOLA RODEADA DE TEJIDO CONJUNTIVO (TC). LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN TEÑIDOS DE MORADO-AZUL (40x)..... 91
- FIGURA 43. HÍGADO T1 PAS.** CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE UNA TRIADA HEPÁTICA (VENA PORTA (VP), ARTERIA (A) CON SU MEMBRANA BASAL (FLECHA) TEÑIDA EN PURPURA Y CONDUCTOS BILIARES (CB)) RODEADO DE HEPATOCITOS (H) DISPUESTOS EN CORDONES. LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN EN COLOR AZUL-MORADO (40x). .. 92
- FIGURA 44. HÍGADO T2 PAS.** CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL DETALLE DE UNA ARTERIA (A) PERTENECIENTE A UNA TRIADA CON SU MEMBRANA BASAL (FLECHA) TEÑIDA DE PURPURA. LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN EN COLOR AZUL-MORADO (40x)..... 92
- FIGURA 45. RIÑÓN T1 PAS.** CORTE DE RIÑÓN FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE UN CORPÚSCULO RENAL (CR) CON LA MEMBRANA BASAL DE LA CAPSULA DE BOWMANN TEÑIDA EN PURPURA (FLECHAS), TÚBULOS CONTORNEADO PROXIMALES (TP) Y DISTALES (TD). LOS NÚCLEOS CELULARES DE LOS PODOCITOS Y DE LAS CÉLULAS DE LOS TÚBULOS CONTORNEADOS SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN (40x). 93
- FIGURA 46. RIÑÓN T2 PAS.** CORTE DE RIÑÓN FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO DE UN CORPÚSCULO RENAL (CR) CON LA MEMBRANA BASAL DE LA CAPSULA DE BOWMANN TEÑIDA EN PURPURA (FLECHAS), SE PERDIÓ UN POCO EL DETALLE DE LOS TÚBULOS

CONTORNEADOS PROXIMALES (TP) Y DISTALES (TD), PERO SUS MEMBRANAS BASALES LOS DEFINEN BIEN. LOS NÚCLEOS CELULARES DE LOS PODOCITOS Y DE LAS CÉLULAS DE LOS TÚBULOS CONTORNEADOS SE ENCUENTRAN BIEN DEFINIDOS POR LA TINCIÓN (40x).....	93
FIGURA 47. ENCÉFALO T1 ZN. CORTE DE ENCÉFALO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN NEURONAS (FLECHAS) CON NÚCLEOS BIEN DEFINIDOS, PERO CON UNA GRAN RETRACCIÓN CELULAR EN TODAS ELLAS. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BAAR Y BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x)	94
FIGURA 48. ENCÉFALO T2 ZN. CORTE DE ENCÉFALO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN NEURONAS (FLECHAS) CON NÚCLEOS POCO DEFINIDOS. LAS NEURONAS PRESENTAN MUY Poca O NULA RETRACCIÓN CELULAR. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BAAR Y BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x)	94
FIGURA 49. PÁNCREAS T1 ZN. CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE LOS ACINOS PANCRÉATICOS (AP) TEÑIDOS EN AZUL. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BAAR Y BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x).....	95
FIGURA 50. PÁNCREAS T2 ZN. CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO POCO DEFINIDO DE LOS ACINOS PANCRÉATICOS (AP) TEÑIDOS EN AZUL. SE PERDIÓ LA HISTOLOGÍA GENERAL DEL TEJIDO. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BAAR Y BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x).....	95
FIGURA 51. HÍGADO T1 ZN. CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE UNA TRIADA HEPÁTICA (VENA PORTA (VP), ARTERIA (A) Y CONDUCTOS BILIARES (CB)) RODEADO DE HEPATOCITOS (H) DISPUESTOS EN CORDONES. LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN TEÑIDOS EN COLOR AZUL. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BAAR Y BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x)	96
FIGURA 52. HÍGADO T2 ZN. CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO DE UNA TRIADA HEPÁTICA (VENA PORTA (VP), ARTERIA (A) Y CONDUCTOS BILIARES (CB)) RODEADO DE HEPATOCITOS (H) DISPUESTOS EN CORDONES. LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN TEÑIDOS EN COLOR AZUL. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BAAR Y BACILO DE LA TUBERCULOSIS (40x)	96
FIGURA 53. CORAZÓN T1 ZN. CORTE DE CORAZÓN FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN FIBRAS DE MÚSCULO CARDÍACO EN CORTE TRANSVERSAL (FM) SIN TINCIÓN, MIENTRAS QUE LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN TEÑIDOS DE AZUL (40x)	97
FIGURA 54. CORAZÓN T2 ZN. CORTE DE CORAZÓN FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN FIBRAS DE MÚSCULO CARDÍACO EN CORTE TRANSVERSAL (FM) SIN TINCIÓN, MIENTRAS QUE LOS NÚCLEOS CELULARES SE ENCUENTRAN TEÑIDOS DE AZUL (40x)	97
FIGURA 55. PÁNCREAS T1 MASSON. CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE LOS ACINOS PANCRÉATICOS (AP). EN LA PARTE DERECHA SUPERIOR DE LA FOTOMICROGRAFÍA SE APRECIA LA COLÁGENA MADURA (CM) TEÑIDA EN COLOR AZUL (40x).98	
FIGURA 56. PÁNCREAS T2 MASSON. CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T2 (PEG), EL ARREGLO DE LOS ACINOS PANCRÉATICOS (AP) SE ENCUENTRA POCO DEFINIDO. SE APRECIA LA COLÁGENA MADURA (CM) TEÑIDA EN COLOR AZUL Y EN LA PARTE IZQUIERDA DE LA FOTOMICROGRAFÍA SE OBSERVA TEJIDO CONJUNTIVO (TC) (40x)	98
FIGURA 57. HÍGADO T1 MASSON. CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE OBSERVA EL DETALLE DE UNA TRIADA HEPÁTICA (ARTERIA (A) Y CONDUCTO BILIAR (CB)) RODEADO DE HEPATOCITOS (H) DISPUESTOS EN CORDONES. SE DESTACA LA COLÁGENA MADURA DE LA TRIADA TEÑIDA EN COLOR AZUL-VERDE (CM) (40x)	99
FIGURA 58. HÍGADO T2 MASSON. CORTE DE HÍGADO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE OBSERVA EL DETALLE DE UNA TRIADA HEPÁTICA (VENA PORTA (VP), ARTERIA (A) Y CONDUCTO BILIAR (CB)). SE DESTACA LA COLÁGENA MADURA DE LA TRIADA TEÑIDA EN COLOR AZUL (CM) (40x) ...	99
FIGURA 59. RIÑÓN T1 MASSON. CORTE DE RIÑÓN FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL ARREGLO DE UN CORPÚSCULO RENAL (CR) CON LA COLÁGENA MADURA QUE LO RODEA TEÑIDA EN AZUL-VERDE (FLECHA), LOS TÚBULOS CONTORNEADO PROXIMALES (TP) Y DISTALES (TD) QUE PRESENTAN AUTOLISIS, ASÍ COMO VASOS SANGUÍNEOS CON ERITROCITOS (*) (40x).....	100
FIGURA 60. RIÑÓN T2 MASSON. CORTE DE RIÑÓN FIJADO CON EL 2 (PEG), SE APRECIA EL ARREGLO DE DOS CORPÚSCULOS RENALES (CR) CON LA COLÁGENA MADURA QUE LO RODEA TEÑIDA EN AZUL-VERDE (FLECHA), TÚBULOS CONTORNEADO PROXIMALES (TP) Y DISTALES (TD) QUE PRESENTAN AUTOLISIS AVANZADA, ASÍ COMO VASOS SANGUÍNEOS CON ERITROCITOS (*) (40x).....	100
FIGURA 61. CORAZÓN T1 MASSON. CORTE DE CORAZÓN FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN FIBRAS DE MÚSCULO CARDÍACO EN CORTE TRANSVERSAL (FM) TEÑIDAS DE COLOR ROSA-ROJO MIENTRAS QUE LA COLÁGENA MADURA (CM) SE ENCUENTRA TEÑIDA DE AZUL (40x).101	
FIGURA 62. CORAZÓN T2 MASSON. CORTE DE CORAZÓN FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN FIBRAS DE MÚSCULO CARDÍACO EN CORTE TRANSVERSAL (FM) TEÑIDAS DE COLOR ROSA-ROJO MIENTRAS QUE LA COLÁGENA MADURA (CM) SE ENCUENTRA TEÑIDA DE AZUL (40x).101	
FIGURA 63. ENCÉFALO T1 GRAM. CORTE DE ENCÉFALO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN LAS NEURONAS (FLECHAS) Y TODO EL TEJIDO TEÑIDO CON DISTINTAS TONALIDADES DE ROSA-ROJA Y LAS NEURONAS PRESENTAN UNA GRAN RETRACCIÓN CELULAR. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x)	102
FIGURA 64. ENCÉFALO T2 GRAM. CORTE DE ENCÉFALO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN LAS NEURONAS (FLECHAS) Y TODO EL TEJIDO TEÑIDO CON DISTINTAS TONALIDADES DE ROSA-ROJA Y LAS NEURONAS PRESENTAN LIGERA RETRACCIÓN CELULAR. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).....	102

FIGURA 65. MÚSCULO T1 GRAM. CORTE DE MÚSCULO FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN FIBRAS MUSCULARES (FM) EN CORTE LONGITUDINAL TEÑIDAS DE COLOR ROJO-ROSA INTENSO. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	103
FIGURA 66. MÚSCULO T2 GRAM. CORTE DE MÚSCULO FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN FIBRAS MUSCULARES (FM) EN CORTE LONGITUDINAL TEÑIDAS DE COLOR ROJO-ROSA. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	103
FIGURA 67. PULMÓN T1 GRAM. CORTE DE PULMÓN FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIA EL EPITELIO ALVEOLAR (E) FORMANDO LOS ALVEOLOS (A). DEBIDO A QUE SE TRATA DE UN PULMÓN CON EDEMA, SE APRECIAN ERITROCITOS (FLECHAS) EN LOS ALVEOLOS. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	104
FIGURA 68. PULMÓN T2 GRAM. CORTE DE PULMÓN FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIA EL EPITELIO ALVEOLAR (E) FORMANDO LOS ALVEOLOS (A). DEBIDO A QUE SE TRATA DE UN PULMÓN CON EDEMA, SE APRECIAN ERITROCITOS (FLECHAS) Y MACRÓFAGOS (M) EN LOS ALVEOLOS. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	104
FIGURA 69. PÁNCREAS T1 GRAM. CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T1 (FORMOL), SE APRECIAN LOS ACINOS PANCREÁTICOS (AP) TEÑIDOS DE REJO-ROSA SIN EL DETALLE NUCLEAR. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	105
FIGURA 70. PÁNCREAS T2 GRAM. CORTE DE PÁNCREAS FIJADO CON EL T2 (PEG), SE APRECIAN LOS ACINOS PANCREÁTICOS (AP) TEÑIDOS DE REJO-ROSA SIN EL DETALLE NUCLEAR Y CON CIERTO GRADO DE AUTOLISIS. LA TINCIÓN ES NEGATIVA PARA BACTERIAS TANTO GRAM POSITIVAS COMO NEGATIVAS (40x).	105

ANEXO II

FIGURA 71. PERFIL GENÉTICO CADÁVER 1. SE MUESTRA EL PERFIL GENÉTICO DEL CADÁVER 2 OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO MUSCULAR EN FRESCO.	106
FIGURA 72. PERFIL GENÉTICO CADÁVER 2. SE MUESTRA EL PERFIL GENÉTICO DEL CADÁVER 2 OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO CEREBRAL EN FRESCO.	107
FIGURA 73. PERFIL GENÉTICO CADÁVER 3. SE MUESTRA EL PERFIL GENÉTICO DEL CADÁVER 3 OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO CEREBRAL EN FRESCO.	108
FIGURA 74. PERFIL GENÉTICO CADÁVER 4. SE MUESTRA EL PERFIL GENÉTICO DEL CADÁVER 4 OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO CEREBRAL EN FRESCO.	109
FIGURA 75. PERFIL GENÉTICO CADÁVER 5. SE MUESTRA EL PERFIL GENÉTICO DEL CADÁVER 5 OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO CEREBRAL EN FRESCO.	110
GRÁFICA 1. CANTIDAD DE ADN DEPENDIENTE AL TIEMPO Y TRATAMIENTO DE FIJACIÓN. SE MUESTRA UNA COMPARACIÓN ENTRE LA PÉRDIDA DEL ADN RESPECTO AL TIEMPO Y TIPO DE FIJADOR CONTRA EL ADN OBTENIDO DE TEJIDO FRESCO. EN EL EJE X SE MUESTRA EL TIEMPO Y TRATAMIENTO DE FIJACIÓN, MIENTRAS QUE EN EL EJE Y SE MUESTRA LA CANTIDAD (NG/μL) DE ADN OBTENIDO.	52
GRÁFICA 2. CUANTIFICACIÓN DE ADN. SE MUESTRAN UNA COMPARACIÓN DE LAS CANTIDADES DE ADN OBTENIDOS A PARTIR DE LOS TRES TIPOS DE MUESTRA: TEJIDO FRESCO, TEJIDO INCLUIDO EN BLOQUE DE PARAFINA FIJADO EN EL TRATAMIENTO 1 (BP-T1) Y TEJIDO INCLUIDO EN BLOQUE DE PARAFINA FIJADO EN EL TRATAMIENTO 2 (BP-T2). EN EL EJE (X) SE MUESTRAN LOS RESULTADOS POR ÓRGANO Y LOS NÚMEROS INDICAN EL CADÁVER AL QUE PERTENECE LA MUESTRA, EN EL EJE (Y) SE MUESTRA LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDO EN NG/μL.	62
GRÁFICA 3. CANTIDAD DE ADN OBTENIDO A PARTIR DE TEJIDO FIJADO EN LOS TRATAMIENTOS 1 Y 2. SE MUESTRA LA COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDO DE LAS EXTRACCIONES A PARTIR DE BLOQUES DE PARAFINA DE LOS TRATAMIENTOS 1 (FORMOL) BP-T1 Y TRATAMIENTO 2 (PEG) BP-T2. EN EL EJE (X) SE MUESTRAN LOS RESULTADOS POR ÓRGANO Y LOS NÚMEROS INDICAN EL CADÁVER AL QUE PERTENECE LA MUESTRA, EN EL EJE (Y) SE MUESTRA LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDO EN NG/μL.	62
GRÁFICA 4. PROMEDIO DE LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDO. SE MUESTRA LA COMPARACIÓN DE LOS PROMEDIOS DE CUANTIFICACIÓN DE CADA ÓRGANO EN LOS TRES TIPOS DE MUESTRA: TEJIDO FRESCO, TEJIDO INCLUIDO EN BLOQUE DE PARAFINA FIJADO EN EL TRATAMIENTO 1 (BP-T1) Y TEJIDO INCLUIDO EN BLOQUE DE PARAFINA FIJADO EN EL TRATAMIENTO 2 (BP-T2). EN EL EJE (X) SE MUESTRAN LOS ÓRGANOS MIENTRAS QUE EN EL EJE (Y) SE MUESTRA LA CANTIDAD DE ADN OBTENIDO EN NG/μL.	63
TABLA 1. CANTIDAD DE ADN DEPENDIENTE AL TIEMPO Y TRATAMIENTO DE FIJACIÓN. SE MUESTRA LA CANTIDAD DE ADN (NG/μL) OBTENIDO A PARTIR DE 50 MG DE TEJIDO MUSCULAR FRESCO (MUESTRA DE REFERENCIA) Y 50 MG DE TEJIDO FIJADO EN LOS T1 (FORMOL) Y T2	

(PEG) A DISTINTOS TIEMPOS, ASÍ COMO TAMBIÉN SE MUESTRA EL PORCENTAJE DE ADN RECUPERADO EN CADA TIEMPO Y TRATAMIENTO RESPECTO AL ADN RECUPERADO EN EL TEJIDO FRESCO QUE SE CONSIDERÓ COMO EL 100%.....	51
TABLA 2. CONSERVACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TEJIDOS. SE MUESTRA UNA VALORACIÓN DE LA CONSERVACIÓN HISTOLÓGICA DE CADA TEJIDO DE ACUERDO AL TIPO DE FIJADOR QUE FUE UTILIZADO T1 (FORMOL) O T2 (PEG). *MALA. LA FIJACIÓN FUE INFERIOR A LA ESPERADA. **REGULAR. LA FIJACIÓN ES CASI LA ESPERADA. ***BUENA. LA FIJACIÓN ES LA ESPERADA. ****EXCELENTE. LA FIJACIÓN ES MEJOR A LA ESPERADA.	56
TABLA 3. TINCIONES HISTOLÓGICAS. SE MUESTRA UNA VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPERADAS EN CADA UNA DE LAS TINCIONES UTILIZADAS (HE, PAS, ZN, MASSON Y GRAM) Y SE HACE LA COMPARACIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS FIJADORES 1 Y 2. *MALO. LOS RESULTADOS SON INFERIORES A LOS ESPERADOS. **REGULAR. LOS RESULTADOS SON CASI LOS ESPERADOS. ***BUENO. LOS RESULTADOS SON LOS ADECUADOS Y/O ESPERADOS CON FORMOL. ****EXCELENTE. LOS RESULTADOS SON MEJORES A LOS ESPERADOS A LAS METODOLOGÍAS TRADICIONALES. NV No VALORABLE. CARACTERÍSTICAS QUE NO SE PUDIERON DETERMINAR DEBIDO A QUE LAS MUESTRAS ERAN NEGATIVAS PARA LA CARACTERÍSTICA SOLICITADA.	60
TABLA 4. CUANTIFICACIÓN DE ADN. SE MUESTRAN LAS CANTIDADES DE ADN OBTENIDO (NG/μL) DE LOS SIETE TEJIDOS TRABAJADOS DE CADA UNO DE LOS CADÁVERES. BP-T1: BLOQUE DE PARAFINA TRATAMIENTO 1, BP-T2: BLOQUE DE PARAFINA TRATAMIENTO 2.	61
TABLA 5. PROMEDIO DE CUANTIFICACIÓN DE ADN POR ÓRGANO. SE MUESTRAN LOS PROMEDIOS DE LAS CANTIDADES (NG/μL) DE ADN PARA CADA ÓRGANO EN LA MUESTRA DE REFERENCIA (TEJIDO FRESCO) Y LOS TRATAMIENTOS DE FIJACIÓN BP-T1: BLOQUE DE PARAFINA TRATAMIENTO 1, BP-T2: BLOQUE DE PARAFINA TRATAMIENTO 2.	63
TABLA 6. CALIDAD DEL ADN (GRADO DE DEGRADACIÓN) DE ACUERDO LOS MARCADORES GENÉTICOS NO DETECTADOS. EN LA SECCIÓN 1 DE LA TABLA SE MUESTRAN LOS DATOS CORRESPONDIENTES A LOS PERFILES GENÉTICOS PARCIALES OBTENIDOS EN CADA TIPO DE MUESTRA TRABAJADA. EL NÚMERO EN CADA MARCADOR CORRESPONDE AL NÚMERO DE PERFILES GENÉTICOS EN LOS QUE NO FUE DETECTADO ESE MARCADOR. EN LA SECCIÓN 2 LA SUMA DE MARCADORES REPRESENTA EL NÚMERO DE VECES QUE NO FUE POSIBLE LA DETECCIÓN DE ESTOS EN TODAS LAS MUESTRAS ANALIZADAS. EL PORCENTAJE POR MARCADOR INDICA EL VALOR EXPRESADO EN PORCENTAJE DEL TOTAL DE MARCADORES QUE NO FUERON DETECTADOS.	66

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ARN	Ácido Ribonucleico
BAAR	Bacteria ácido-alcohol resistente
BP	Bloque de Parafina
BT	Bacilo de la Tuberculosis
C	Citosina
DTT	Ditiotrietol
EC	Electroforesis Capilar
G	Guanina
G+	Gram positivo
G-	Gram negativo
H_a	Hipótesis alternativa
H_o	Hipótesis nula
HE	Hematoxilina-Eosina
PAS	Ácido Peryodico de Schiff
PEG	Polietilen Glicol
PP-F	PowerPlex Fusion
RFU	Unidades Fluorescentes de Referencia
SNP	Polimorfismos de un Sólo Nucleótido
STR	Repeticiones Cortas en Tándem
T	Timina
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
ZN	Ziehl-Neelsen

RESUMEN

Las muestras biológicas forenses en muchas ocasiones representan la principal evidencia de una línea de investigación. Es por ello que su preservación y tratamiento resultan de vital importancia para la obtención de resultados que permitan generar una opinión técnica útil en el esclarecimiento de un hecho. El método de preservación de tejidos blandos mayormente utilizado es mediante bloques de parafina, procedimiento que requiere de la fijación del tejido. En la actualidad los fijadores que son utilizados no son capaces de preservar todas las características que un tejido fresco posee, algunos de ellos preservan las características tisulares, pero no las enzimáticas y viceversa. El presente trabajo propone el uso del Polietilen Glicol (PEG) como fijador para tejidos blandos con el fin de preservar tanto el arreglo histológico del tejido como el ADN disminuyendo o minimizando el proceso de degradación. Se comparó el uso de PEG como fijador con respecto a uno de los fijadores mayormente utilizados que es el formol al 10% en 7 tipos de tejido: nervioso, cardíaco, hepático, muscular, pancreático, pulmonar y renal; se valoró su capacidad de fijación, su afinidad con 5 tinciones histológicas (HE, PAS, Tricrómica de Masson, ZN y Gram), así como la capacidad de preservar el ADN conforme la cantidad y calidad de ADN que se obtiene del tejido después de haber sido fijado. Los resultados demuestran que el PEG preserva de manera adecuada el arreglo histológico en 6 de los 7 tejidos que fueron sometidos a prueba y no interviene en la afinidad de los colorantes hacia los componentes celulares y tisulares en las técnicas de tinción utilizadas, además de que la recuperación del ADN a partir de los tejidos fijados en PEG es superior al doble de las cantidades recuperadas de los tejidos fijados en formol. El PEG preserva el ADN de alto peso molecular, ya que se obtuvo el perfil completo del 98% (26/28) de las muestras trabajadas mientras que la fijación con formol únicamente permitió la obtención de perfiles completos en tan sólo 42% (12/28) de las muestras, demostrando así que el PEG preserva de mejor manera el ADN tanto en cantidad y calidad, comparado con el formol. Se concluye que el PEG puede funcionar exitosamente como fijador para muestras de tejido blando, que sean requeridas en distintas áreas forenses.

INTRODUCCIÓN

La ciencia forense es la aplicación de técnicas y principios científicos que proporcionen evidencia a investigaciones y determinaciones de carácter legal (Tilstone, *et al.*, 2006), es una especialidad cuyo objetivo es ayudar a los jueces en la solución de problemáticas legales, no sólo de tipo criminal, sino también en materia civil; es un campo con gran amplitud que cruza los límites entre la biología, química, física y matemáticas. Incluye disciplinas tan variadas como la antropología, la botánica, la balística, la dactiloscopia, la entomología, la odontología, la genética, la patología, el estudio de sonidos grabados, la grafología, etc. (Jobling y Gill, 2004).

La investigación forense de una muerte se puede dividir en tres etapas principales (1) investigación inicial, la cual incluye la evaluación de la escena del crimen, (2) la examinación del cuerpo que puede incluir o no la realización de una necropsia y (3) la subsecuente investigación de los hechos (Prahlow y Byard, 2012). Dentro de las muchas líneas a seguir que se involucran en una investigación forense, la determinación de las causas de muerte y la identificación de los individuos ocupan un papel de suma importancia y, para lograr dicho cometido se requiere de la colaboración de disciplinas como medicina forense, toxicología, patología, antropología, odontología, dactiloscopia, genética, entre otras.

Determinación de las causas de muerte

La determinación de las causas de muerte de un individuo está a cargo del médico forense, quien mediante la necropsia identifica y clasifica las muertes naturales y principalmente las no naturales. Las necropsias, son solicitadas por las autoridades y resultan útiles para determinar las causas de muerte y para el correcto reconocimiento e investigación de un crimen (accidentes, suicidios, homicidios, etc.) (Dettmeyer, 2011; Prahlow y Byard, 2012). La medicina forense abarca muchas disciplinas que deben ser utilizadas en conjunto para la determinación de las causas de muerte, siendo la patología forense una de las disciplinas mayormente requeridas para llevar a cabo dicha tarea.

Identificación humana

La identificación de cadáveres representa un reto tanto para el gobierno, como para los médicos forenses y una de las responsabilidades mayores se encuentra con la familia del fallecido, ya que es a ellos a quienes se les debe notificar lo antes posible si se trata o no de su familiar la persona fallecida, para que de ésta manera ellos puedan darle el seguimiento adecuado al cuerpo en cuestión.

Existen distintos métodos de identificación de cadáveres, los cuales van desde lo más convencional, como lo son la identificación visual por parte de sus familiares y la comparación de las huellas dactilares. Sin embargo, en muchas ocasiones el cuerpo se

encuentra en condiciones que no le permiten ser identificado mediante los métodos convencionales y se tienen que recurrir a métodos un poco más especializados, como lo es el desarrollo de un perfil antropológico en el cual se estime la edad, el sexo, la ancestría y la estatura del individuo; si dichas características coincidieran con las del individuo en cuestión, los restos óseos del cadáver tendrían que compararse con registros médicos *antemortem* como radiografías, evidencia de traumas o implantes ortopédicos, etc., que desgraciadamente en muchas ocasiones no se cuenta con ellos, lo que imposibilita una identificación certera (Hebda, 2013). Cuando las disciplinas de identificación como la dactiloscopia, odontología y antropología se ven superadas por las características del cadáver, es necesario recurrir a metodologías moleculares que permitan lograr a cabo el cometido de la identificación y es aquí donde la genética forense encuentra su papel.

MARCO TEÓRICO

Patología e histopatología forense.

La patología es una especialidad de la medicina que involucra el estudio de heridas y enfermedades. Por su parte, la patología forense es una subespecialidad de la patología que se ocupa específicamente de la investigación de las muertes súbitas, inesperadas y/o violentas, por lo que su práctica involucra técnicas patológicas en la investigación de episodios letales, donde el principal instrumento de investigación utilizado por los patólogos forenses es la necropsia. La necropsia puede ser dividida en la examinación externa, donde se examinan y documentan las características externas del cuerpo, color de piel, ojos y cabello, lunares, tatuajes, cicatrices, así como la documentación de heridas, lesiones, golpes etc., y en la examinación interna, que es en donde se lleva a cabo la disección de los órganos con la finalidad de revisar si existe o no la presencia de enfermedades o heridas (Prahlow y Byard, 2012). En algunas ocasiones la identificación de las causas de muerte no puede determinarse por las características macroscópicas observadas y es necesaria la visualización microscópica de los tejidos, y es aquí donde la histopatología es requerida (Dettmeyer, 2011).

La histopatología se encarga del estudio microscópico de los tejidos orgánicos, de identificar las anomalías que permitan realizar un diagnóstico de una patología determinada a partir de tejidos provenientes de biopsias o bien determinar las causas que han provocado la muerte del individuo en el caso de muestras provenientes de cadáveres. En las ciencias forenses, la histopatología tiene una gran importancia ya que muchos de los mecanismos de muerte no se pueden apreciar a simple vista, el estudio histopatológico provee de información adicional sobre las causas de muerte, permitiendo una mejor documentación de las lesiones traumáticas y se estima que aproximadamente el 8.4% de las determinaciones de las causas de muerte se llevan a cabo gracias al estudio histopatológico (Dettmeyer, 2011).

Tipo de muestras y su preservación

La patología forense trabaja con muestras de tejido blando que son seleccionadas durante la necropsia. La muestra consiste en una cantidad considerable de tejido del órgano seleccionado, el cual puede mandarse en fresco al laboratorio de patología o en fijación. El tipo de tejido será seleccionado de acuerdo a las presuntas causas de muerte del individuo o en caso de desconocerlas, las muestras más comunes para una revisión histopatológica son los llamados órganos vitales (corazón, pulmones, cerebro, hígado, riñones y páncreas). Existen dos maneras principales de preservación de la muestra: una a corto plazo que es la fijación y preservación en formol (formaldehído) en la cual las muestras podrán permanecer algunas semanas; pero si lo que se busca es una preservación a largo plazo se utilizan los

tejidos incluidos en parafina, donde el tejido puede preservarse por años (Guerra y Aguirre, 2009).

El método de preservación de tejidos blandos más utilizado durante décadas han sido los bloques de parafina o bloques parafinados, los cuales permiten conservar la mayoría de las características histológicas por un largo tiempo además de que son fáciles de almacenar y transportar (Rivero *et al.*, 2006). Los tejidos incluidos en parafina son una fuente importante de material para diagnóstico e investigación, constituyen un frecuente material de archivo para la realización de estudios clínicos retrospectivos y además representan un recurso invaluable para estudiar la patogenia molecular de las enfermedades, así como la expresión génica diferencial. Sin embargo, aunque éste método de preservación permite conservar el arreglo histológico, compromete la calidad del ADN y ARN dificultando los estudios de biología y/o patología molecular (García *et al.*, 2006).

Sumado a esto, algunas investigaciones demuestran que en los bloques de parafina se observa una pérdida de la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina, así como de los lípidos; y de manera general el tejido sufre daños ocasionados por algunos de los compuestos utilizados y metodologías de la técnica como lo son el formol y las altas temperaturas que se requieren en el proceso de parafinado (Sriramachari y Ramalingaswami, 1952).

Alternativas metodológicas en los bloques parafinados

Como anteriormente se mencionó, los bloques parafinados resultan un buen método de preservación de tejidos, si lo que se busca es preservar el arreglo histológico, sin embargo, para estudios moleculares resultan poco útiles ya que degradan en gran medida el material genético, algunas enzimas, lípidos y otros componentes celulares que comprometen su posterior estudio; es por ello que se han buscado alternativas en la metodología de los tejidos incluidos en bloques de parafina, tanto en el proceso de fijación como en el proceso de inclusión.

Fijadores

Si bien es cierto que son muchos los factores que afectan la degradación del ADN, el uso de fijadores toma un lugar significativo, ya que en la mayoría de los casos el fracaso en la recuperación de ADN viable se debe al tratamiento de fijación, de los cuales el formol es el principal agente. El formaldehído (HCHO) es el principal constituyente del formol; y diversos estudios demuestran que degrada el ADN debido a que produce entrecruzamiento de los ácidos nucleicos y proteínas, hidroliza los puentes fosfodiéster del ADN y modifica covalentemente el ARN por adición de grupos monometilo en las bases, generando así problemas en la obtención de material genético de buena calidad, lo que disminuye el rendimiento en la amplificación por PCR (García *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009).

Con el fin de evitar el uso del formol durante la fijación de los tejidos se han utilizado distintos tipos de fijadores, como lo son el formol acompañado de un buffer de fosfatos,

formol con un buffer libre de fosfatos, formol con distinto pH (4, 6, 7 y 8), etanol al 70% y fijadores de zinc, con el objetivo de encontrar un método alternativo que dañe en menor medida al ADN. De los fijadores anteriormente mencionados, resulta más eficiente el etanol al 70% y más agresivo el formol cuando se utiliza a pH bajo (García *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2014).

Medios de inclusión

Los Polietilen Glicol (PEGs) [HOCH₂ (CH₂OCH₂)_x CH₂OH], son una familia de hidrocarburos de cadena lineal solubles en agua polimerizados con enlaces éter que resultan ser un material cristalino neutral y biocompatible (Smithson *et al.*, 1983; Burcu *et al.*, 2011), que por sus características químicas no degrada componentes celulares como las grasas, el glucógeno y las nucleoproteínas a diferencia de los fijadores utilizados convencionalmente (Sriramachari y Ramalingaswami 1952).

Los PEGs con un peso molecular de 1000 o superior son los llamados "carbowax" o tipo cera, que conforme aumenta su peso molecular se vuelven menos solubles en agua y menos higroscópicos, han sido utilizados como medio para embeber tejidos en sustitución a la parafina; demostrando que su uso tiene algunas ventajas sobre el uso de ésta: los tiempos de inclusión se reducen a casi a la mitad, no se requieren temperaturas mayores a 40°C que puedan dañar al tejido, se tienen mejores resultados en las técnicas de inmunohistoquímica debido a una mayor sensibilidad de los tejidos para la detección de los antígenos en las tinciones fluorescentes (Gao y Godkin, 1991), además de que permite realizar un amplio rango de cortes con distintos espesores dependiendo de la densidad del PEG que se utilice, sin embargo, parece producir algunas alteraciones en la membrana como lo son los verticilos o espirales (Smithson *et al.*, 1983).

El PEG no sólo resulta un buen medio para incluir con distintas durezas y puntos de fusión, sino que también resulta un agente deshidratante efectivo ya que no causa encogimientos drásticos de la membrana de los tejidos (Sriramachari y Ramalingaswami, 1952).

Proceso histológico

Se denomina proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Para que un tejido pueda ser visualizado al microscopio, se requiere de una serie de metodologías que permitan la conservación de la estructura del tejido, previniendo de forma inmediata los fenómenos de autólisis y putrefacción. Existen diferentes técnicas que pueden ser utilizadas, las cuales dependerán de las características tisulares que quieran ser observadas, pero siguiendo los pasos fundamentales de fijación, deshidratación, inclusión en medio sólido, corte, tinción del tejido, así como la visualización por microscopía (Pardo, 1998; Megías *et al.*, 2015).

Fijación tisular

La fijación tisular es quizá el paso más importante en todo el proceso histológico, consiste en interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, tratando de conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima a la que poseía el tejido en estado vivo (Pardo, 1998). Es un paso común en todas las técnicas de microscopía y con ella se persiguen cuatro objetivos principales: 1) Detener los procesos de degradación que ocurren durante o tras la muerte celular: autólisis (por liberación de enzimas lisosómicas) y putrefacción (por la presencia de microorganismos que liberan enzimas líticas). Es importante tener en cuenta que la velocidad de degradación depende de la riqueza de enzimas que el órgano posea, así como de las condiciones ambientales en las que se encuentre (temperatura). 2) Insolubilizar los componentes celulares (principalmente las proteínas) mediante enlaces cruzados o desnaturalización, permitiendo así que se preserven en el tejido. 3) Dotar al tejido de una consistencia adecuada para manipulaciones posteriores. El fijador ideal debe ser capaz de mantener la forma y el volumen de las estructuras que se van a estudiar. 4) Facilitar las técnicas de tinción o análisis posteriores (Montuenga *et al.*, 2009).

Debido a que no existe un fijador universal, por lo regular, se tiene que seleccionar al fijador en función de los objetivos a investigar, por ello en algunos casos se deberá favorecer la preservación morfológica, la molecular o la funcional. Sin importar cuál sea el fijador que se vaya a utilizar, se deben tomar en cuenta características importantes: poder de penetración, poder de fijación, la osmolaridad y pH de cada uno de ellos. El poder de penetración hace referencia a la velocidad de difusión de la sustancia fijadora en el tejido y el poder de fijación es aquel que depende de las propiedades químicas del fijador. Tanto la velocidad de fijación como la velocidad de penetración condicionarán el tiempo de fijación del tejido. Por su parte es indispensable evitar cambios bruscos en el volumen de la célula, es por ello que se busca que los fijadores sean isoosmóticos con las células, por lo que en muchas ocasiones es necesario ajustar la osmolaridad de las soluciones fijadoras; situación similar a la del pH, donde se busca que los fijadores sean soluciones tamponadas a un pH próximo al fisiológico. De manera general los métodos de fijación se pueden clasificar en dos tipos físicos y químicos (Megías *et al.*, 2015).

Fijación física

La fijación física se basa en una congelación muy rápida del tejido o bien en la aplicación de calor elevado. Son utilizados cuando los fijadores químicos alteran las estructuras que se desean observar o cuando se necesita una fijación muy rápida.

Criocongelación

La congelación rápida o criocongelación es un buen método de preservación para las características moleculares. Se recomienda una rápida congelación ya que de ésta manera

se evitará la formación de grandes cristales que rompan o alteren la estructura del tejido. Para ello se sumerge el tejido en isopentano (-170°C) enfriado con nitrógeno líquido o sumergiéndolo directamente en nitrógeno líquido (-196°C). Se recomienda no utilizar piezas mayores a 2 mm para que la congelación no se retarde en las zonas centrales del tejido y para una mejor protección tisular se recomienda el uso de anticongelantes o crioprotectores. Una desventaja de la criocongelación es que cuando el tejido se descongela hay que protegerlo nuevamente de los procesos de degradación y putrefacción (Megías *et al.*, 2015; Montuenga *et al.*, 2009).

Fijación por calor.

La fijación se produce debido al calor generado mediante radiaciones de microondas, esto porque al aumentar la energía térmica de las moléculas bipolares (agua y cadenas laterales polares de las macromoléculas) en el tejido, las proteínas se desnaturalizan y, en menor medida pueden establecerse puentes de unión entre ellas. Utiliza temperaturas de entre 45 y 55°C, es poco preciso y con un escaso poder de penetración no mayor a 15 mm (Megías *et al.*, 2015; Montuenga *et al.*, 2009).

Fijación química

La fijación química es la más utilizada en los procedimientos histopatológicos, utiliza soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas del tejido, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación, sin embargo, en muchas ocasiones este tipo de fijadores dañan al tejido física y químicamente. El método de fijación química mayormente utilizado es la inmersión, el cual consiste en sumergir los tejidos en la solución fijadora; se recomienda que el grosor del tejido no sobrepase los 0.5 cm y que el volumen del fijador sea 20 veces el del tejido, esto para asegurar una buena fijación (Megías *et al.*, 2015).

Existen un sinnúmero de soluciones fijadoras que según su acción sobre el tejido se consideran entrecruzantes o precipitantes. Los primeros dan lugar a un entrecruzamiento de las proteínas mediante la formación de puentes de hidroxmetileno entre el fijador y las moléculas de la proteína. Éstas pasan de estado sólido a gel y forman una trama especial que preserva la posición relativa inicial de las proteínas solubles al inmovilizarlas, a la vez que dota al tejido de consistencia mecánica; los aldehídos son los fijadores entrecruzantes más comunes. Los fijadores precipitantes desnaturalizan las proteínas modificando su estructura terciaria y su estado coloidal, estabilizan el tejido y aumentan la consistencia mecánica en mayor grado, su principal desventaja es que alteran considerablemente la morfología del tejido produciendo procesos de retracción evidentes. Se clasifican en alcohólicos, ácidos y metálicos y los fijadores de este tipo mayormente utilizados son el metanol y el etanol (Montuenga *et al.*, 2009). A continuación, se describen algunos de los fijadores mayormente utilizados, así como las ventajas y desventajas de utilizar cada uno de ellos.

Etanol y metanol.

Se trata de moléculas higroscópicas que retiran el agua del tejido de modo que se alteran los enlaces hidrofílicos e hidrofóbicos de las proteínas (y otras macromoléculas), modificando su estructura terciaria, cuaternaria y precipitando, extraen los lípidos de los tejidos y no afectan los carbohidratos, pero sí destruyen algunos organelos como las mitocondrias. Preservan muy bien la reactividad y la antigenicidad molecular ya que producen relativamente pocos cambios químicos. Por lo regular, se utilizan para la fijación de muestras de tamaño pequeño y cuando la finalidad es la preservación de proteínas, enzimas, glucógeno y pigmentos, pero no el arreglo histológico de la muestra (Megías *et al.*, 2015; Montuenga *et al.*, 2009).

Aldehídos (Formaldehído y glutaraldehído)

Los aldehídos reaccionan con los residuos básicos de los aminoácidos y cambian ligeramente el punto isoeléctrico de las proteínas. Sin duda alguna el formaldehído es el fijador mayormente usado porque preserva la estructura general de la célula y componentes extracelulares, provoca poca retracción del tejido y por su compatibilidad con la mayoría de las tinciones histológicas. Sin embargo, apenas y reacciona con los lípidos lo que lo hace un mal fijador de las membranas celulares. El formaldehído se une a grupos funcionales de las proteínas formando grupos hemiacetales, lo que provoca que muchas enzimas se inactiven evitando así la degradación del tejido por enzimas hidrolíticas. Es un gas incoloro que se comercializa en solución acuosa saturada al 37-40% (formalina concentrada), pero en anatomía patológica se utiliza al 10%, generalmente tamponado a pH neutro. La fijación con formaldehído no es una fijación rápida, normalmente es de 24 a 50 horas, aunque puede llegar a ser de entre 1 a 2 semanas; pero puede ser reversible si se le aplica un exceso de agua dentro de las primeras 24 horas. Sin embargo, si se realizan fijaciones muy prolongadas se puede provocar la inestabilidad de los ácidos nucleicos (Montuenga *et al.*, 2009; Megías *et al.*, 2015; Pardo, 1998).

Por su parte, el glutaraldehído se trata de un compuesto bifuncional cuyos grupos aldehído también reaccionan con los grupos polares de las proteínas, de modo que también da lugar a puentes de unión entre ellas, tiene una alta capacidad para preservar la estructura celular y por ello es el fijador de referencia para la observación ultraestructural con microscopio electrónico. Genera fijaciones rápidas e irreversibles, sin embargo, tiene una escasa capacidad de penetración lo que puede llegar a generar retracciones del tejido. En general, el formaldehído preserva mejor la naturaleza química y las propiedades reactivas de las moléculas comparado con el glutaraldehído, sin embargo, el glutaraldehído preserva mucho mejor la morfología del tejido, pero provoca la pérdida de hasta el 30% de la estructura alfa-hélice de las proteínas (Montuenga *et al.*, 2009; Megías *et al.*, 2015).

Ácido pícrico

La fijación se produce porque las sales de picrato coagulan las proteínas de los tejidos. Es un fijador que preserva bien la estructura celular, no produce retracciones cuando el tiempo de fijación es el óptimo, además de que preserva el glucógeno y los lípidos. Es un buen fijador para tinciones generales puesto que tiene efecto mordiente y favorece la unión de los colorantes, sin embargo, puede dificultar la penetración de la parafina (Megías *et al.*, 2015).

En muchos procesos de fijación se utilizan varias sustancias fijadoras, mezcladas en una solución acuosa inicial o utilizadas sucesivamente en el tiempo, de esta manera se pueden aprovechar las ventajas de cada fijador y contrarrestar sus desventajas. Los componentes y las proporciones de los fijadores en este tipo de mezclas dependerán nuevamente de las características del tejido y del objetivo del estudio (Megías *et al.*, 2015, Montalvo, 2010).

Mezclas con formaldehído.

Puesto que el formaldehído es el fijador más utilizado hoy en día, se suele disolver en soluciones tamponadas que tengan una osmolaridad similar a la del tejido que se pretende fijar, se pueden utilizar con una mezcla de fosfatos (fosfato de sodio monobásico y de sodio dibásico), con mezcla de cloruro de calcio, bicloruro de mercurio o con glutaraldehído; en ésta última, la función del formaldehído es iniciar una fijación rápida, por su mayor capacidad de penetración, mientras que el glutaraldehído realizará una fijación más poderosa, pero más lenta que no afectará a la estructura tisular puesto que el formaldehído ya ha realizado una fijación previa (Megías *et al.*, 2015, Montalvo, 2010).

Líquido de Bouin.

Está compuesto por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial, es un buen fijador de uso rutinario ya que tiene un alto poder de fijación y penetración; es ampliamente utilizado ya que permite aplicar un amplio espectro de tinciones ofreciendo resultados satisfactorios con ciertos tricrómicos entre ellos el de Masson. Es una fijación que no debe exceder las 48 horas de fijación si se lleva a cabo por inmersión y es importante eliminar el ácido pícrico mediante lavados en etanol 70% para permitir una buena inclusión en parafina y tinciones adecuadas (Megías *et al.*, 2015, Montalvo, 2010).

Fijador de Carnoy

Está formado por etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial. Posee un excelente poder de penetración y fijación, por lo que solo requiere de dos o tres horas para que un tejido u órgano se fije. Es ampliamente utilizado cuando se quiere fijar el glucógeno, los hidratos de carbono y proteínas fibrosas, sin embargo, produce la lisis de eritrocitos y no resulta útil para preservar la morfología nuclear y los grumos de Nissl del sistema nervioso, además de que puede producir retracciones celulares (Megías *et al.*, 2015, Montalvo, 2010).

Deshidratación y diafanización

Posterior a la fijación del tejido, éste se debe someter a un proceso de deshidratación ya que la mayoría de los medios de inclusión (parafina y monómeros plásticos) son inmiscibles en agua y si ésta no es retirada, la parafina no podrá penetrar en el tejido y no se alcanzará la dureza necesaria. La deshidratación consiste en remover toda el agua del tejido, para lo cual se utilizan líquidos deshidratantes en los cuales se sumerge el tejido. Se utilizan baños sucesivos con concentración creciente del deshidratador. El alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el dioxano y el cloroformo son ejemplos de deshidratantes que pueden ser utilizados, siendo el alcohol etílico el agente deshidratante mayormente utilizado (Montalvo, 2010).

Una vez realizada la deshidratación, ahora el tejido se encuentra totalmente embebido en alcohol y como la parafina de igual manera es insoluble en éste, es necesario su remplazo por líquidos diafanizadores o intermediarios. Los líquidos diafanizadores son sustancias capaces de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina, algunos ejemplos son el xilol, el tolueno, el benceno y el cloroformo, siendo el primero de ellos el más utilizado. Generalmente se realiza un baño con la mezcla de alcohol etílico absoluto y xilol [50:50], para después realizar baños únicamente con xilol y asegurar así que el tejido quede libre de etanol (Montalvo, 2010).

Para finalizar, se realizan baños en parafina, esto para que el xilol sea desplazado por la parafina y el tejido adquiera la dureza necesaria para los siguientes pasos del proceso histológico. Es importante que en cada uno de los pasos anteriores el tejido se encuentre en agitación constante para una mejor obtención de resultados. A continuación, se muestra un protocolo general de la deshidratación y la diafanización del tejido, así como la infiltración de la parafina en él. Se muestran tanto los reactivos utilizados, como la duración y el número de baños realizados con cada uno de los pasos mencionados (Montalvo, 2010).

Deshidratación			Diafanización			Infiltración		
1. Alcohol etílico 70%	12 horas	2 baños	4. Alcohol etílico absoluto + xilol [50:50]	1 hora	1 baño	6. Parafina	1 hora	2 baños
2. Alcohol etílico 96%	1 hora	2 baños	5. Xilol	1 hora	2 baños			
3. Alcohol etílico absoluto	1 hora	2 baños						

Inclusión en medio sólido

La inclusión es el método más utilizado para endurecer los tejidos. Es una técnica que consiste en infiltrar la muestra con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento solidifiquen sin afectar las características del tejido. El endurecimiento del tejido es necesario para que éste pueda ser cortado en laminillas lo suficientemente delgadas (de μm a nm dependiendo el medio de inclusión) para su posterior visualización

al microscopio. Sumado a esto, la inclusión también tiene un papel importante en la preservación del tejido por largos periodos de tiempo (Pardo, 1998, Megías *et al.*, 2015).

Existen diferentes sustancias o medios de inclusión dependiendo del grosor del corte y la técnica que se desee realizar. Cuando la muestra se observará en microscopios ópticos, los medios de inclusión más utilizados son la parafina o la celoidina (Megías *et al.*, 2015).

Inclusión en parafina

El principal agente empleado para la inclusión es la parafina debido a su rápida preparación y su fácil manipulación. Las parafinas son hidrocarburos saturados que a temperatura ambiente son sustancias sólidas, a temperaturas de entre los 40 y los 70°C se tornan líquidas y que hierven a los 300°C. De acuerdo a su punto de fusión se van a clasificar en parafinas blandas aquellas con un punto de fusión de 45-52°C, semiduras con puntos de fusión de entre los 54 y 58°C y en parafinas duras con puntos de fusión mayores a 60°C; siendo las parafinas semiduras las mayormente utilizadas en las técnicas histológicas permitiendo cortes de 5-7 μm (Pardo, 1998; Montalvo, 2010).

La inclusión o formación del bloque de parafina se efectúa empleando moldes de diferentes áreas y profundidades, en los cuales será vertida la parafina caliente y será colocado el tejido (previamente infiltrado con parafina), teniendo cuidado de darle una correcta orientación de acuerdo a la dirección en la que se efectuará el corte y, de inmediato debe colocarse en una superficie fría o dentro del refrigerador para asegurar una solidificación homogénea (Montalvo, 2010).

Microtoma

Una vez que los tejidos se encuentran en un bloque sólido ya sea de parafina o resina, se debe realizar el corte de secciones delgadas (3-10 μm) del tejido que permitan la difusión y la penetración de la luz al momento de ser observadas bajo microscopio óptico o la penetración de electrones en el caso del microscopio electrónico de transmisión. Para ello se utilizan instrumentos mecánicos diseñados para seccionar el bloque en cortes delgados de grosor uniforme denominados micrótomos. Existen distintos tipos de micrótomos, los cuales resultan útiles de acuerdo al medio de inclusión que haya sido utilizado (Megías *et al.*, 2015; Montalvo, 2010).

Microtomo

Es el instrumento más utilizado para realizar cortes cuando el medio de inclusión es parafina y de acuerdo a su mecanismo de corte se distinguen dos tipos de microtomo: de rotación y de desplazamiento. El microtomo de rotación o tipo Minot funciona mediante una manivela circular denominada volante, que es la encargada de desplazar el mecanismo que sujeta al bloque de parafina frente al filo de la navaja de arriba a abajo en movimiento vertical permitiendo así el corte del bloque. Realiza cortes muy precisos de 2 a 25 μm de espesor,

además de que produce cortes seriados, es decir, cada uno de los cortes queda adherido con el borde del corte anterior y posterior formando una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja. Este tipo de cortes son útiles cuando se requieren comparar secciones vecinas del tejido u órgano. Por su parte, el microtomo de deslizamiento realiza movimientos horizontales de atrás hacia delante ya sea del bloque o de la cuchilla para realizar los cortes. El movimiento es manual y generalmente el mecanismo que sujeta al bloque de parafina es el que se desplaza, mientras que la navaja permanece estática. Son utilizados cuando se tienen porciones voluminosas de tejidos y órganos. (Megías *et al.*, 2015, Montalvo, 2010; Sandoval, 2005).

Criostato

En general éste tipo de equipos cuenta con un microtomo tipo Minot en el interior de una cámara refrigerada la cual, mediante un sistema de compresión, con funcionamiento automático, mantiene temperaturas entre los -60 y 0°C o entre los -30 a 30°C. La cámara fría está cubierta por una gruesa lámina de material plastificado o de vidrio transparente, construida por dos partes de las que una puede plegarse o deslizarse sobre la otra. Se utiliza para muestras cuya fijación fue por métodos fríos y se logran cortes de entre 10 y 40 µm de grosor que pueden ser visualizados en microscopio óptico (Martínez y Gragera, 2008).

Extensión y adhesión

Cuando se realizan los cortes del tejido, éstos generalmente presentan arrugas y muestran un área menor que la que posee el bloque de la inclusión, por lo que es necesario extenderlos para luego adherirlos a las laminillas o portaobjetos. Para llevar a cabo la extensión el tejido se coloca sobre la superficie de agua, la cual se encuentra en un baño maría con temperaturas de entre 40 y 45°C, y una vez que las arrugas hayan desaparecido el corte es recuperado mediante un portaobjetos. Para que el tejido se adhiera más fácilmente al portaobjetos, al agua se le agregan sustancias adherentes como la grenetina o bicromato de potasio (Montalvo, 2010).

Desparafinado e hidratación

Antes de llevar a cabo la tinción histológica, es necesario eliminar la parafina que se encuentra infiltrada en el tejido y posteriormente llevar a cabo su rehidratación, esto para que el colorante pueda penetrar y teñir el tejido. El proceso de desparafinado puede realizarse mediante calor y/o utilizando un solvente de la parafina. Para ello, los portaobjetos deberán colocarse en una estufa o plancha caliente (50°C aprox.) por al menos media hora para que la parafina se derrita y evapore del tejido. Otra forma de eliminar la parafina del tejido es sumergiéndolo en algún solvente de ésta como el xilol, tolueno, benceno o cloroformo. Se pueden realizar dos o más cambios rápidos (2-3 minutos) en dicho disolvente hasta que el tejido quede libre de parafina (Montalvo, 2010).

Una vez desparafinado el tejido, éste se debe volver a hidratar y para ello se sumerge en un tren de alcoholes, generalmente alcohol etílico, con concentraciones descendentes, contrario al procedimiento seguido en la deshidratación. Se recomienda hacer 2 baños en alcohol etílico absoluto, 2 en alcohol al 96%, 1 en alcohol 70%, 1 con agua corriente y para finalizar 2 baños más con agua destilada (Montalvo, 2010).

Tinción histológica

Aunque los cortes ya se encuentran en el portaobjetos, todavía no están listos para su visualización al microscopio ya que la mayoría de los tejidos animales son en su mayoría incoloros, excepto aquellos que poseen algún tipo de pigmento como la hemoglobina o melanina, esto se debe a que todos los tejidos tienen el mismo índice de refracción lo que dificulta su reconocimiento. El propósito de la tinción es facilitar la visualización de las diferentes estructuras (Sepúlveda, 2011). El procedimiento de tinción o coloración consiste en que una estructura celular o tisular adquiera específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante y se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante no se decolora (Montalvo, 2010).

Tipos de colorantes

Los colorantes son moléculas que poseen tres componentes importantes: un esqueleto incoloro, que normalmente es un anillo aromático de benceno, al cual se le unen dos tipos de radicales: uno que aporta el color, denominado cromóforo y otro que posibilita la unión a elementos del tejido denominado auxocromo. Al conjunto de estos tres elementos unidos en una molécula se denomina cromógeno. Según la naturaleza química del cromóforo los colorantes se clasifican en básicos, ácidos, neutros e indiferentes (Megías *et al.*, 2015; Pardo, 1998).

Colorantes ácidos

Los colorantes ácidos o aniónicos tienen carga eléctrica negativa. Son sales con el anión coloreado y la base incolora. También se les conoce como citoplasmáticos, pues tiñen al grupo químicamente cargado, localizado en un extremo de la cadena de aminoácidos que integran las proteínas citoplasmáticas. Las sustancias que atraen eléctricamente a los colorantes ácidos se denominan acidófilas y químicamente están constituidas por componentes básicos o alcalinos. Ejemplos de colorantes ácidos son la eosina, el amarillo de metanilo, la fucsina ácida, el ácido pícrico, el verde rápido, el naranja G, la safranina, el azul de anilina, etc. (Montalvo, 2010; Megías *et al.*, 2015).

Colorantes básicos

Los colorantes básicos son sales en las que la base aporta el color, mientras que la parte ácida es incolora. Poseen una carga eléctrica positiva, siendo así colorantes catiónicos o también llamados nucleares pues tienen afinidad por los ácidos nucleicos. Las sustancias

teñidas por los colorantes básicos se denominan basófilas y están constituidas por componentes ácidos. Ejemplo de colorantes básicos son la hematoxilina, el rojo nuclear, el azul de metileno, la tionina, el azul de toluidina, la fucsina básica, etc. (Montalvo, 2010; Megías *et al.*, 2015).

Colorantes neutros

Los colorantes neutros poseen una porción ácida y otra básica, ambas con la capacidad de aportar color, por lo que tienen la propiedad de teñir de manera simultánea a los componentes nucleares y citoplasmáticos, además de que pueden proporcionarles colores distintos (metacromasia) a determinados componentes citoplasmáticos como las granulaciones específicas de los granulocitos. Algunos ejemplos son el colorante Wright, May Grünwald, Giemsa, Leischman, etc. (Montalvo, 2010; Megías *et al.*, 2015).

Colorantes indiferentes

Son aquellos que son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Realmente no se unen a elementos de los tejidos por afinidad química sino porque se disuelven en ellos. Se utilizan para demostrar la presencia de grasas en las células y los tejidos, pues tiñen selectivamente a los lípidos; el sudan negro, el sudan III, el sudan IV y el rojo oleoso son ejemplo de colorantes indiferentes (Montalvo, 2010; Megías *et al.*, 2015).

Tipos de tinción

De acuerdo a los procesos por los cuales las células y tejidos son teñidos por los colorantes, existen distintos tipos de coloraciones las cuales pueden ser:

Tinción directa. Se ejerce sobre las células y tejidos cuando éstos se ponen en contacto con la solución colorante, el resultado es un indicativo de una verdadera afinidad entre el tejido y el colorante. Ejemplo: Tinción de núcleos por azul de metileno (Montalvo, 2010).

Tinción indirecta. Se necesita de sustancias intermediarias (mordientes) que faciliten la adhesión del colorante en las estructuras tisulares. El mordiente se aplica antes del colorante o puede formar parte del mismo. Ejemplo: Tinciones con hematoxilina (Montalvo, 2010).

Tinción simple. Durante su procedimiento se utiliza un solo colorante para teñir algún componente celular o tisular. Ejemplo: Tionina para tinción de núcleos (Montalvo, 2010).

Tinción compuesta o combinada. Durante el procedimiento se utilizan dos o más colorantes con la finalidad de destacar, mediante diferentes colores, estructuras específicas que forman parte de ella. Puede ser simultánea o sucesiva. En la coloración simultánea se utiliza una mezcla de todos los colorantes utilizados en la tinción. Ejemplo: Tricrómico de Van Gieson (fucsina ácida y ácido pícrico), Tricrómico de Mallory (azul de anilina y naranja G) o el Tricrómico de Shorr (verde brillante, fucsina ácida y naranja G). Por su parte en la coloración

sucesiva se aplican soluciones sucesivas de varios colorantes. Ejemplo: Tinción Hematoxilina-Eosina (Montalvo, 2010).

Tinción ortocromática. Es la tinción que ejerce un colorante al teñir una determinada estructura con su propio color. Es la tinción mayormente producida por los colorantes (Montalvo, 2010).

Tinción metacromática. Tinción en la cual un colorante además de ceder su color a una estructura celular o tisular, también puede teñir de un color distinto a otras estructuras. Ejemplo: La tionina y el azul de toluidina colorean de azul a los núcleos y al mismo tiempo tiñe de violeta o rosado ciertos componentes tisulares como la mucina, la matriz cartilaginosa o el ácido hialurónico (Montalvo, 2010).

Tinciones histológicas

Existen un sinnúmero de técnicas convencionales de tinción que se han sido utilizadas por años, y el uso de cada una de ellas dependerá del grado de putrefacción o autólisis que presenta el tejido, la duración y el tipo de fijación, así como de las características que quieran ser observadas en el tejido. A continuación, se describen las características de algunas de las tinciones mayormente utilizadas en los laboratorios de patología forense.

Hematoxilina-Eosina (H-E)

La técnica de tinción histológica mayormente utilizada en los laboratorios es la de Hematoxilina-Eosina (H-E), ya que es fácil de realizar, fiable, barata e informativa. Permite diferenciar en la célula las estructuras basófilas (núcleo y heterocromatina) con un color azul intenso o púrpura, de las estructuras acidófilas (citoplasma) de color rosa a naranja. Ésta tinción, al ser la de rutina, se utiliza en todos los tejidos, ya que permite visualizar a detalle el arreglo histológico, así como algunos detalles celulares (Sepúlveda, 2011; Lowe y Anderson, 2015; Dettmeyer, 2011).

Tinción de Schiff (PAS)

La tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS por sus siglas en inglés) tiene muchas aplicaciones, particularmente en la demostración de distintos hidratos de carbono tanto solos o combinados con otras moléculas como proteínas (ej. glucógeno y glucoproteínas). Los núcleos se tiñen de color azul, el glucógeno de color púrpura y el material PAS+ (polisacáridos simples, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, glucoproteínas y glucolípidos) se tiñe de color rosa. Se puede utilizar para delinear las membranas basales y algunas mucinas neutras segregadas por distintas células epiteliales secretorias. Es común utilizarla para muestras de estómago ya que sus células mucosas son altamente positivas al PAS, así como también se utiliza para teñir el glucógeno de las células positivas Armani-Ebstein en los túbulos renales en el caso de coma diabético (Lowe y Anderson, 2015; Sepúlveda, 2011; Dettmeyer, 2011).

Tinción de van Gieson (EvG)

Tinción que permite mostrar y diferenciar las fibras más comunes de las células de sostén: las fibras elásticas se tiñen de marrón oscuro, las fibras de colágeno de rosa-rojo y el músculo de amarillo. En patología se utiliza para la detección de áreas de fibrosis en el miocardio, fibrosis en otros órganos, cirrosis hepática, así como necrosis quística medial (Lowe y Anderson, 2015; Dettmeyer, 2011).

Tricrómica de Masson

Es una tinción diferencial y policrómica que permite diferenciar el tejido conjuntivo y las fibras de colágena en la matriz extracelular. Los núcleos se tiñen de azul oscuro, el citoplasma, la queratina, las fibras musculares y eritrocitos se tiñen de color rojo, y las fibras de colágeno de azul claro o verde según sea el colorante utilizado (Sepúlveda, 2011; Lowe y Anderson, 2015).

Tinción Ziehl-Neelsen (Z-N)

Es una técnica rápida, fácil y de bajo costo que permite diferenciar las bacterias en dos grupos: aquellas que son ácido-alcohol resistentes (BAAR) y aquellas que no lo son. La ácido-resistencia es una característica específica de la pared celular de las micobacterias ricas en lípidos y consiste en la capacidad de una vez coloreadas con fucsina de Ziehl, mantener la coloración roja aún sometida a tratamientos decolorantes muy energéticos. Es una técnica rutinaria que se utiliza en el diagnóstico de tuberculosis. Las muestras más comunes son muestras de pulmón, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, sinovial y pericárdico o aquellas en donde se sospecha la presencia del bacilo de la tuberculosis (López *et al.*, 2014).

Tinción con orceína

Permite la visualización de fibras elásticas estructuras nucleares. En patología forense permite la detección de hepatitis B por medio de las inclusiones en las células, así como también permite la detección de amiloidosis (Dettmeyer, 2011).

Tinción con azul alciano

Se emplea fundamentalmente para la detección de mucinas ácidas segregadas por algunas células epiteliales y combinada con la reacción PAS se pueden diferenciar entre las mucinas epiteliales ácidas y neutras. Con el control de pH y de otras variables se puede demostrar la matriz extracelular de los glucosaminoglucanos. En patología forense es útil para la detección de lagos mucoides, en casos de necrosis medial Erdheim-Gsell quística idiopática y aneurisma de la aorta (Dettmeyer, 2011; Lowe y Anderson, 2015).

Tinción Gram

Se trata de una tinción diferencial que clasifica a las bacterias Gram negativas y Gram positivas. La composición química y el contenido de peptidoglucanos en la pared celular de

las bacterias, determina las características de tinción de cada bacteria; tiñendo de púrpura a las bacterias G+ y de rosa a las G-. Se utiliza para diferenciar bacterias que pueden ser causantes de infecciones (López *et al.*, 2014).

Montaje

Concluido el proceso de tinción de los cortes, éstos se deben sellar para protegerlos y así evitar el deterioro de la muestra y permitir que pueda ser utilizado en múltiples ocasiones. Para ello, el tejido previamente debe estar deshidratado y para ello se realizan baños sucesivos de alcohol con concentración creciente (Ejemplo: etanol 60%, 70%, 96% y absoluto) y un baño extra con xilol para el aclaramiento del tejido (Sepúlveda, 2011). El procedimiento de montaje, consiste en colocar encima del tejido una gota de una sustancia adherente (resina natural como bálsamo de Canadá o resinas sintéticas como el Entellan[®], cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio) y encima de ellos un cubreobjetos. Para que la resina seque y adquiera solidez suficiente, las laminillas se colocan en una platina caliente (45-50°C) y se dejan secar de 24 a 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo, están listas para ser observadas (Montalvo, 2010).

Microscopía

El último paso del proceso histológico es la observación del tejido. El poder de resolución del ojo humano es de 0.2 mm, mientras que una célula animal suele tener dimensiones que oscilan entre los 10 y 20 µm de diámetro, que es alrededor de una quinta parte del objeto más pequeño que puede ver el ojo humano (Alberts, *et al.*, 2015); esto implica que para visualizar a las células necesitamos instrumentos que nos permitan aumentar la imagen de las muestras para discriminar estructuras tisulares diminutas como las células y sus organelos (Megías *et al.*, 2015). Los microscopios son los instrumentos más importantes para la identificación y la comprensión de la estructura de la célula, los tejidos y los órganos; y de manera general existen dos tipos: los microscopios ópticos y los electrónicos. En el área de patología forense el microscopio óptico es el más utilizado ya que no es necesaria de la visualización de ultraestructuras para la determinación de las causas de muerte.

Microscopio óptico

El microscopio óptico o microscopio de luz utiliza la luz visible y lentes de cristal que permiten un aumento de las muestras de unas 1000 veces con un poder de resolución de 0.2 µm, permitiendo la visualización de células y bacterias. En esencia está compuesto por una fuente luminosa incorporada en el pie del microscopio, un sistema de lentes encargados de formar la imagen que vemos, objetivos que permiten distintos aumentos, una platina sobre la cual se coloca la preparación histológica, sistemas de diafragmas que aumentan la claridad de la imagen y un condensador que focaliza la luz hacia los objetivos. Existen ligeras modificaciones a los microscopios ópticos, lo que permite distintas maneras de visualizar a los tejidos (Megías *et al.*, 2015; Welsch y Sobotta 2008).

Microscopio de contraste de fase

Como su nombre lo dice, intensifica el contraste de las estructuras celulares que apenas son visibles en el microscopio óptico normal. Necesita de objetivos especiales y se basa en un ligero retraso que sufre la luz cuando pasa por las estructuras tisulares en función de la densidad. De esta manera se consiguen diferentes luminosidades para las distintas estructuras tisulares. Se emplea para ver muestras sin teñir y/o células vivas de cultivos celulares (Welsch y Sobotta, 2008; Megías *et al.*, 2015).

Microscopio de campo oscuro

Consiste en la incorporación de un objeto opaco bajo el condensador (entre la fuente de luz y la sección de tejido), éste objeto sólo deja pasar la luz más lateral que incide sobre la muestra de forma oblicua. Sólo la luz que es reflejada por la muestra llega a los objetivos y la cantidad de luz reflejada depende de las distintas densidades y propiedades del tejido; en las zonas donde no hay tejido se apreciará oscuro (Megías *et al.*, 2015).

Microscopía de contraste de interferencia de Nomarski

Permite visualizar a los tejidos en un aspecto tridimensional, debido a que aumentan la profundidad del campo (espesor de tejido que está simultáneamente enfocado). Se basa en el uso de filtros que polarizan la luz, lo cual consiste en dejar pasar únicamente a las ondas electromagnéticas que vibran en un determinado plano. Posteriormente pasan por un prisma que reagrupa esa luz en elementos separados por una distancia que es similar al poder de resolución del objetivo que se está usando. Entonces la luz pasa por el tejido y las diferencias en su densidad, provocarán alteraciones en la luz que se dirige hacia los objetivos, los cuales transforman esas diferencias en cambios en la luminosidad, dando un aspecto tridimensional a las células. Se utiliza para estudiar células vivas, pero también puede aplicarse para la observación de tinciones inmunohistoquímicas, en las cuales sólo están teñidas las células aisladas y su entorno carece de tinción (Megías *et al.*, 2015, Welsch y Sobotta, 2008).

Microscopio de fluorescencia.

Permite visualizar estructuras unidas a fluorocromos mediante la técnica de inmunofluorescencia. Los fluorocromos usados en microscopía absorben en el rango de la luz ultravioleta y emiten en el rango de la luz visible. Para seleccionar el rango de longitud de onda con que serán iluminados se utilizan filtros específicos localizados entre la fuente de luz y la muestra, dejando pasar sólo un determinado rango de frecuencias. Con un tambor de filtros se consigue iluminar la muestra con diferentes rangos de ondas electromagnéticas y por tanto activar selectivamente a diferentes fluorocromos, lo que permite detectar varias moléculas tisulares de manera simultánea (Megías *et al.*, 2015).

Genética Forense

La genética forense es la aplicación de conocimientos de genética para la resolución de casos legales y uno de sus principales objetivos es la identificación del origen de una muestra biológica con la mayor certeza posible (Mark, 2004) la cual puede tratarse de material recuperado en escenas del crimen, muestras para pruebas de parentesco biológico y/o paternidad, así como muestras provenientes de restos humanos de los cuales se busca llevar a cabo su identificación (Goodwin *et al.*, 2011).

Es una disciplina que se encarga del análisis de las variaciones genéticas, tarea que dio inicio hace ya más de un siglo con el descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO. Específicamente, la primera metodología que utilizó el ADN para la identificación fueron los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés), los cuales facilitaban el análisis separando los fragmentos de ADN en un arreglo ordenado por tamaño en un gel de agarosa por medio de electroforesis, dichos fragmentos eran producto de la acción de enzimas de restricción que reconocían combinaciones específicas de bases nucleotídicas (Baird, 1996). Sin embargo, fue hasta que Alec Jeffreys quien descubrió los loci hipervariables (conocidos como minisatélites) que la revolución del ADN comenzó; y es que era posible detectar muchos minisatélites independientes de manera simultánea, obteniendo así, patrones de múltiples bandas que se denominaban huellas dactilares del ADN, las cuales individualmente tenían una probabilidad de coincidencia mayor a 3×10^{-11} y dos pruebas en conjunto elevaban el valor a 5×10^{-19} . A pesar de la gran utilidad de los minisatélites, posteriormente la atención se centró en sondas específicas de un locus (SLPs por sus siglas en inglés), las cuales tenían una fácil interpretación gracias a que sólo muestran un único fragmento altamente polimórfico. Éstos marcadores fueron los primeros en ser utilizados en una investigación criminal basada en el ADN, dando pruebas contundentes para la resolución de los casos (Mark, 2004).

Con la implementación de la técnica de PCR se incrementó la sensibilidad de detección permitiendo el análisis de muestras con ADN degradado. A partir de éste momento otro tipo de marcadores comenzaron a utilizarse, ejemplo de ello son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés), los cuales resultaban útiles cuando los SLPs fallaban, sin embargo, tenían un bajo poder de discriminación cuando se utilizaban pocos marcadores, la interpretación de mezclas es complicada de interpretar y lo costoso de sus equipos de análisis con algunas razones por las cuales fueron rápidamente descartados. Gracias al descubrimiento de las repeticiones cortas en tándem (STRs por sus siglas en inglés) los sistemas de identificación individual obtuvieron la importancia que tienen hoy en día (Mark, 2004).

ADN, la molécula de la vida

La genética forense basa sus estudios en el ácido desoxirribonucleico (ADN), molécula que es considerada "la molécula de la vida", ya que en ella se encuentra contenida toda la información necesaria que un organismo necesita para cumplir sus funciones vitales (Goodwin *et al.*, 2011). El ADN es una molécula que consiste en una doble cadena o hebra de polinucleótidos, compuestas por cuatro tipos de nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina); los cuales se encuentran unidos covalentemente a través del grupo fosfato y la desoxirribosa (azúcar). Ésta unión convierte al ADN en una molécula con polaridad, la cual se indica haciendo referencia al extremo 3' y al extremo 5', nombres que se derivan de la orientación del azúcar (ver Fig. 1) (Alberts *et al.*, 2015). A su vez, ambas cadenas se unen mediante puentes de hidrógeno, siguiendo el principio de complementariedad del ADN, es decir, la guanina siempre se unirá a la citosina y la adenina se unirá con la timina (ver Fig. 2) (Lenhinger, 2009).

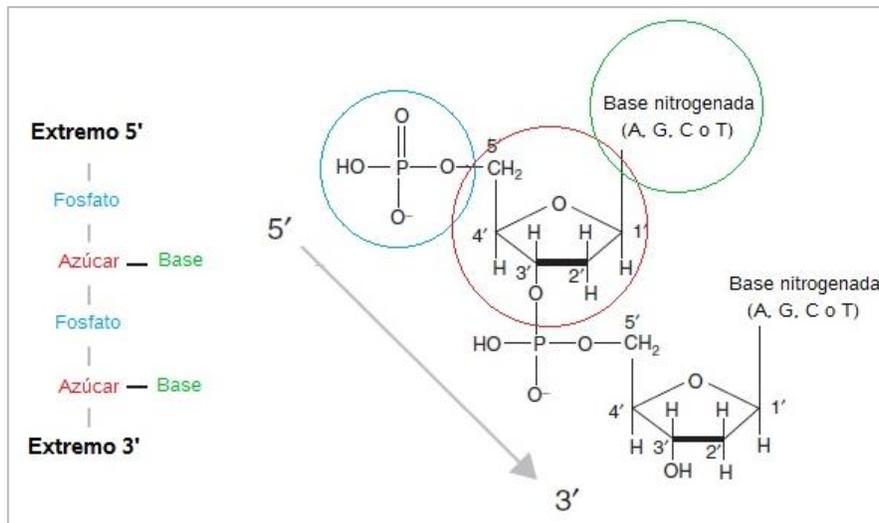


Figura 1. Componentes básicos de los ácidos nucleicos. Esqueleto del fosfato (azul), el azúcar (rojo) y las bases nitrogenadas (verde) que se unen al azúcar. Se muestra como la posición de los fosfatos y el azúcar determinan el sentido de la cadena (Tomado y modificado de Buttler, 2009).

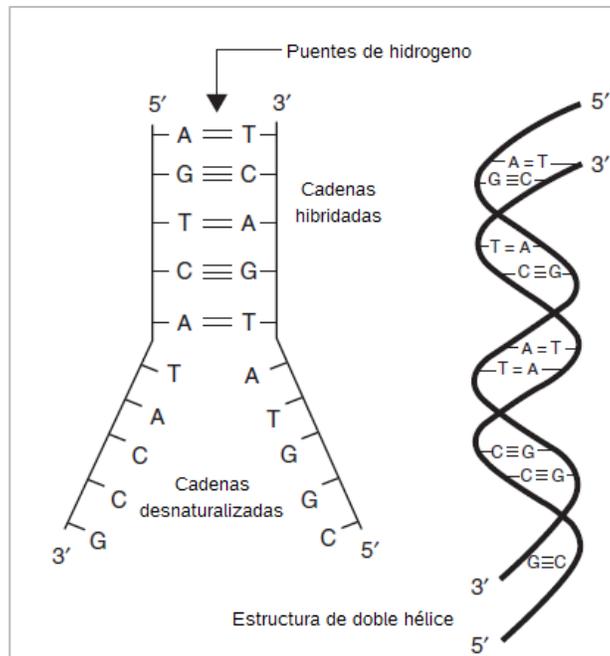


Figura 2. Apareamiento de las bases en las cadenas de ADN para formar la estructura de doble hélice. Unión de las bases nitrogenadas bajo el principio de complementariedad- (Tomado y modificado de Buttler, 2009).

En las células animales podemos encontrar dos tipos de ADN, el nuclear y el mitocondrial (ADNmt). Cada uno de ellos tiene una localización distinta en la célula, número de copias y estructura física. El primero como su nombre lo indica, se encuentra en el núcleo celular y consta de dos copias de ADN lineal, provenientes cada una de un progenitor; se trata de una secuencia única de nucleótidos para cada individuo, excluyendo a los gemelos monocigóticos cuya secuencia es igual, se encuentra altamente empaquetado mediante proteínas llamadas histonas y alcanza su máximo nivel de compactación en estructuras denominadas cromosomas. Por su parte el ADN mitocondrial se encuentra contenido en las mitocondrias y una sola célula puede tener cientos de copias, se trata de ADN circular cuya herencia es vía materna (ver Fig. 3). A pesar de las diferencias entre estos tipos de ADN, ambos pueden ser utilizados para establecer relaciones de parentesco (Hebda, 2013), esto gracias a que el ADN presenta grandes promedios de variación que lo hacen sumamente informativo con un grado de confianza alto (Mark, 2004).

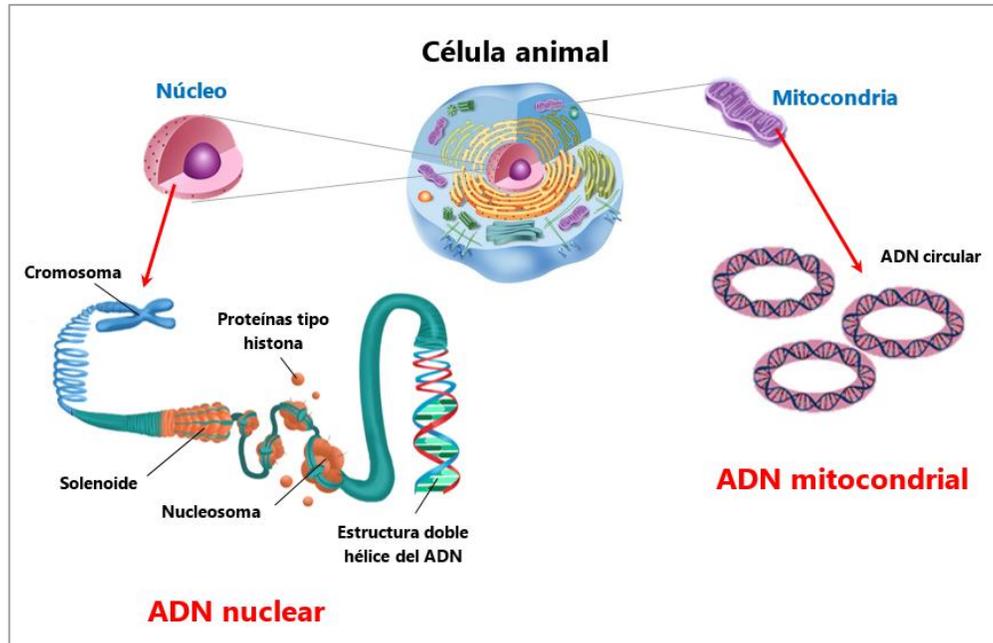


Figura 3. Tipos de ADN animal. Se ejemplifica la estructura y niveles de compactación del ADN nuclear, la estructura del ADN mitocondrial, así como su localización en la célula para ambos casos.

Marcadores genéticos

Un marcador genético se define como una secuencia de ADN con un componente variable que permite identificar diferencias entre individuos y que puede ser localizado en una posición concreta en el genoma. A los componentes variables se les denomina polimorfismos y a cada una de las variantes de un marcador se le conoce como alelo. Cuando un individuo posee dos alelos iguales, se le conoce como homocigoto para ese marcador genético y cuando tiene dos alelos distintos se dice que es heterocigoto (Blanco, *et al.*, 2007).

De manera general, los marcadores genéticos pueden dividirse en dos tipos: los autosómicos y los de linaje. Los primeros, son marcadores bialélicos, donde cada alelo es heredado por cada uno de los progenitores (Casado y Guillén, 2014), a su vez los marcadores autosómicos los podemos dividir en los llamados **microsatélites**, que son repeticiones de una secuencia corta (de entre 2-8 pb) como GCT, GATA, etc. Los diferentes alelos de un microsatélite se diferencian en el número de repeticiones cortas que llevan. Son marcadores que presentan un alto grado de variabilidad y normalmente se encuentran en regiones no codificantes, sin embargo, pueden afectar regiones reguladas del gen; y en los **polimorfismos de un solo nucleótido** o (SNP por sus siglas en inglés), los cuales son variaciones en una sola base, se estima que en el genoma humano hay alrededor de 10 millones de SNP. A su vez se pueden clasificar en: 1) No sinónimos. Se localizan en los exones del gen y afecta a la secuencia codificante del gen y a la secuencia de aminoácidos de la proteína. 2) Sinónimos. Afecta la secuencia codificante pero no causa cambios en la proteína. 3) No codificantes. Se

encuentran en los intrones, y pueden alterar secuencias regulatorias o alterar el procesamiento del ARN mensajero. 4) Inserciones/Deleciones. Como su nombre lo indica, consiste en la adición o pérdida de una o varias bases nucleotídicas en una posición concreta (Blanco, *et al.*, 2007).

Por su parte los marcadores de linaje son aquellos que nos ayudan a determinar la ancestría de los individuos. Los marcadores de linaje más utilizados son el ADN mitocondrial, STRs del cromosoma Y, así como de cromosoma X. Éste tipo de marcadores se heredan uniparentalmente y lo que se compara es el haplotipo y cuando éste coincide se puede decir que pertenecen al mismo linaje. Los resultados a partir de marcadores de linaje no pueden aplicarse para la individualización de una muestra, ya que los resultados pueden ser aplicables a un linaje completo. Es por ello que para casos de identificación se prefiere utilizar marcadores autosómicos que permitan la individualización de una muestra (Casado y Guillen, 2014). A continuación, se describen algunos de los marcadores genéticos forenses mayormente utilizados para la identificación humana.

Repeticiones cortas en tándem (STRs)

Actualmente los marcadores genéticos mayormente utilizados son las repeticiones cortas en tándem (STRs), las cuales son secuencias que contienen unidades repetidas de 2-8 pb de longitud, se encuentran altamente distribuidas en el genoma y son los loci más polimórficos en el genoma humano; juegan un importante rol en la etiología de un gran número de enfermedades genéticas y son de utilidad en las ciencias forenses, en la genética de poblaciones, en la genealogía genética, en la identificación humana, etc. (Willems, *et al.*, 2014; Merkel y Gemmell, 2008). En los laboratorios forenses juegan un papel muy importante ya que, aun teniendo muestras con ADN degradado, se pueden obtener tipificaciones con dichos marcadores. Hoy en día, los kits comerciales multiplex de STRs para identificación son ampliamente utilizados en la mayoría de los laboratorios a nivel mundial debido a su fácil uso y su alto poder de discriminación (Ruitberg, *et al.*, 2001).

Actualmente existen distintos kits de identificación basados en STRs y las diferencias entre ellos radica en los marcadores utilizados y el número de ellos, siendo más solicitados aquellos con una mayor batería de marcadores que aumenten la confiabilidad de la prueba, Identifiler[®], PowerPlex[®] 16 System, PowerPlex[®] Fusion System, PowerPlex[®] Y23 System, Investigator[®] Argus X-12 son algunos de los kits mayormente utilizados hoy en día. A continuación, se hace una descripción del kit utilizado en el presente trabajo.

PowerPlex[®] Fusion System (Promega)

Es un kit de identificación con aplicaciones forenses, pruebas de parentesco biológico y de investigación, que incluye el análisis de 24 loci, 13 de ellos incluidos en el Sistema de Índice Combinado de ADN (CODIS) y 12 incluidos en el European Estándar Set loci (EES) y la amelogenina para la determinación de género. Adicional, cuenta con un locus específico del

cromosoma Y (DYS391) que funciona para identificar alelos nulos para amelogenina del cromosoma Y. Los loci Penta E y Penta D son incluidos para incrementar el poder de discriminación y permitir la búsqueda en bases de datos que incluyen estos loci. Finalmente, dos de los loci populares en las bases de datos (D2S1338 y D19S433) de igual manera se incluyen para aumentar el poder de discriminación. Es un grupo de marcadores de STRs que pretende cubrir las recomendaciones tanto del CODIS como del ESS. En la Fig. 4 se muestra una tabla con los marcadores contenidos en el kit, sus tamaños y alelos posibles para cada uno de ellos (Promega, 2016).

Marcador	Tamaño mín (pb)	Tamaño máx (pb)	Alelos posibles
AMEL	80.0	92.0	X, Y
D3S1358	93.0	150.0	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
D1S1656	151.0	207.0	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20.3
D2S441	207.5	247.5	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17
D10S1248	248.0	295.0	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D13S317	295.2	350.0	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
Penta E	354.5	474.9	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D16S539	73.0	129.0	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D18S51	129.1	215.5	7, 8, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
D2S1338	218.0	299.0	10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28
CSF1PO	309.0	363.0	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
Penta D	370.0	461.0	2.2, 3.2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
TH01	69.0	118.0	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3
vWA	122.0	192.0	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
D21S11	198.0	266.5	24, 24.2, 25, 25.2, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38
D7S820	267.0	316.0	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
D5S818	316.5	379.0	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
TPOX	387.0	443.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
DYS391	443.6	495.0	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
O8S1179	72.0	131.2	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
D12S391	131.4	191.0	14, 15, 16, 17, 13.3, 18, 18.3, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
D19S433	191.5	256.5	5.2, 6.2, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18, 18.2
FGA	257.0	415.0	14, 15, 16, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26, 27, 28, 29, 30, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 48.2, 50.2
D22S1045	420.0	472.0	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

Figura 4. Marcadores del Kit Power Plex Fusion System. Se muestran los marcadores que contiene el kit de identificación PP-F, los tamaños mayores y menores de cada uno de ellos, así como los posibles alelos para cada marcador (Tomado y modificado de Promega, 2016).

Marcadores alternativos a los STRs

A pesar de la gran utilidad de los STRs, el relativo gran tamaño de su amplicones (150-500 pb) imposibilitan la obtención de muestras con ADN altamente degradado y con un bajo número de copias de material genético; es por eso que se han buscado marcadores alternativos como lo son los mini-STRs, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés), polimorfismos de inserción/delección (InDels) e incluso cuando el ADN nuclear se ve superado, se recurre al uso de ADN mitocondrial (Pereira, *et al.*, 2009).

Mini-STRs

Los mini-STRs son marcadores polimórficos con amplicones pequeños que van de los 50 a los 150 pb, que mejoran el análisis de ADN degradado. Estos marcadores han proporcionado patrones plenamente concordantes con los de los STRs clásicos, lo que aumenta su confianza al momento de su uso; además de que podrían proveer adicional poder estadístico en casos de personas desaparecidas, pruebas de paternidad y análisis complejos de pruebas

de parentesco. Sin embargo, la interpretación de los datos requiere de análisis genético de la población de referencia en la frecuencia de ese perfil de ADN (Burguete *et al.*, 2015).

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Otro tipo de marcadores genéticos son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que son la variación en la secuencia de una sola base entre individuos en un determinado punto en el genoma. Al ser muy abundantes en el genoma han sido utilizados para estudios de linaje y el rastreo de enfermedades genéticas. Su tamaño es menor a las 50 pb, lo que los hace ideales para muestras con ADN altamente degradado, no existen artefactos asociados a cada alelo, lo que simplifica la interpretación de los mismos, además de que es posible predecir el origen étnico y ciertos rasgos físicos si se tiene una cuidadosa selección de los SNP. Sin embargo, una gran desventaja de éste tipo de marcadores es que se requiere del análisis de secuencias o la hibridación por microchip, tecnologías que resultan costosas y no todos los laboratorios de genética forense las tienen implementadas (Buttler, 2005).

Polimorfismos de inserción/delección (InDels)

Otro tipo de variación que puede ayudar en la identificación humana son los polimorfismos de inserción/delección (InDels). Se trata de polimorfismos de longitud creados por la ganancia o la pérdida de uno o más nucleótidos en el genoma, son marcadores alternativos al uso de los SNPs o los STR ya que permiten la obtención de perfiles genéticos a partir de muestras con ADN altamente degradado (Pereira *et al.*, 2009). Son marcadores bialélicos que se generan a partir de una sola mutación, se caracterizan por su bajo rango de mutación comparado con los STRs, su amplia distribución en el genoma, sus tamaños de amplicones de 50-150pb y se analizan por medio de corrimiento electroforético igual que los STRs (Zidkova *et al.*, 2013).

ADN mitocondrial (RHV1 y RHV2)

El uso del ADN mitocondrial (ADNmt) se utiliza como complemento a las pruebas de identificación forense de rutina o cuando la identificación no pudo llevarse a cabo mediante el ADN nuclear debido a la baja cantidad de ADN recuperado de una muestra. Debido al gran número de copias de ADNmt encontradas en una célula, aun cuando se trate de muestras altamente degradadas, es posible obtener un resultado para establecer una relación de parentesco; ésta no será específica a nivel individuo como con los marcadores autosomales, pero si es posible determinar linajes maternos. Las denominadas Región Hipervariable 1 (RHV1) y Región Hipervariable 2 (RHV2) encontradas en la región no codificante del ADNmt o D-loop, son las que presentan la mayor variación genética y son las utilizadas para complementar los estudios de identificación. Una desventaja de trabajar con el ADNmt es que las muestras se pueden contaminar con mucha facilidad, por lo que se recomiendan áreas específicas para trabajar éste tipo de ADN, áreas con las que desgraciadamente muchos laboratorios no cuentan; otra desventaja es que se requiere de

la secuenciación de dichas regiones para su posterior análisis, técnica que no es accesible para muchos laboratorios debido a sus altos costos (Divne *et al.*, 2005).

Tipos de muestras y su preservación

El ADN se encuentra presente en cada célula nucleada de los seres vivos y gracias a la técnica de PCR se ha extendido el rango de posibilidades de aislamiento y estudio del ADN de un sinnúmero de tipos de materiales biológicos y no biológicos como lo es la sangre, el semen, la saliva, tejidos blandos, tejidos duros, cabello, dientes, cepillos dentales, colillas de cigarro, botellas de agua, secreciones nasales, labiales, marcas de mordidas, etc. (Buttler, 2011). Dependiendo el caso, el tipo de muestra que será requerida y trabajada en los laboratorios de genética forense, es decir, mientras que en escenas del crimen las muestras más comunes son manchas de sangre y/o semen, cuando se trata de la identificación de un cadáver desconocido las muestras más recurrentes son sangre, tejidos blandos y tejidos duros. El tipo de muestra ideal a trabajar dependerá de su estado de conservación ya que, si la muestra presenta signos de degradación como putrefacción y calcinación, más complicada será la obtención del ADN (Graham *et al.*, 2007).

De manera general se prefiere realizar la toma de muestra de fluidos biológicos como sangre y saliva debido a su fácil acceso, pero cuando se trata de cadáveres, éste tipo de muestras son las primeras en sufrir degradación o contaminación, por el contrario a los tejidos blandos como el músculo (esquelético y cardíaco) y el cartílago soportan de mejor manera la degradación y por encontrarse en cavidades cerradas es menos factible la contaminación cruzada en ellos, además de que representan una fuente con grandes cantidades de ADN, las cuales pueden ser utilizadas para la obtención de perfiles genéticos que permitan llevar a cabo la identificación de la persona fallecida.

Sin importar el tipo de muestra que se vaya a trabajar, se le debe de dar un buen tratamiento de almacenaje para evitar que la muestra se contamine por bacterias y hongos, además de que se preserve durante largos periodos de tiempo donde se conserve el ADN con el menor grado de degradación posible. De manera general, existen dos estrategias para la preservación del ADN: 1) A temperatura ambiente en una matriz sólida en seco o deshidratadas 2) Bajas temperaturas (congelamiento). La deshidratación ayuda a prevenir la hidrólisis del ADN y lo protege de enzimas digestivas llamadas ADNasas que lo degradan, mientras que las bajas temperaturas (-20 a -80°C) proveen las condiciones adecuadas para que la descomposición enzimática, bacteriana y fúngica disminuyan en gran medida. Sin embargo, ninguno de los métodos de preservación (deshidratación o congelamiento) se comparan con la calidad del ADN almacenado a largo plazo en nitrógeno líquido o criopreservación; pero a pesar de ello los métodos de preservación "en frío" resultan ser los mayormente utilizados (Butler, 2011; Baust, 2008).

Respecto a los tejidos blandos, existen una gran variedad de métodos que permiten su preservación a temperatura ambiente. Los tejidos se pueden almacenar deshidratados (ya

sea mediante deshidratación por calor o con NaCl), o también se pueden utilizar buffers de almacenaje los cuales por su contenido, detienen la acción de algunas de las enzimas encargadas de degradar el ADN permitiendo así su preservación; ejemplo de ello son el buffer de lisis, almacenaje y transporte (LST por sus siglas en inglés) o el buffer Orange™, los cuales se ha reportado que mantienen al ADN en óptimas condiciones hasta por 8 semanas almacenados a temperatura ambiente. Sin embargo, son los tejidos incluidos en bloques de parafina el método de preservación a temperatura ambiente preferido para muchas disciplinas, en las que se exceptúa la genética, ya que gracias al tratamiento que recibió el tejido para ser incluido en el bloque, el tejido se encuentra perfectamente deshidratado y la parafina evita el crecimiento bacteriano y fúngico en el tejido (Graham *et al.*, 2007).

Análisis del ADN

Existen cientos de protocolos que permiten llevar a cabo el análisis del ADN, los cuales son seleccionados de acuerdo al tipo de muestra, los recursos que se tengan y el propósito del estudio (Nishiguchi *et al.*, 2002). A pesar de lo heterogéneos que pueden llegar a ser dichos protocolos, todos ellos siguen una serie de metodologías básicas en el proceso de análisis del ADN: la extracción, la cuantificación, la amplificación y la genotipificación del material genético. A continuación, se describe en qué consiste cada metodología y algunos de los métodos mayormente utilizados a nivel mundial en cada una de ellas.

Métodos de extracción de ADN

La extracción de ADN consiste en el aislamiento del material genético y para ello es necesario romper las membranas celulares y nucleares que mantienen contenido al ADN, así como eliminar las proteínas y otros componentes celulares o componentes externos que dificulten su posterior análisis.

De manera general, todos los protocolos de extracción constan de tres fases. La primera consiste en la preparación de la muestra, es decir, aquellos pasos que permitan tener la muestra en las condiciones óptimas para ser trabajada, la limpieza, la maceración y el corte son algunas de ellas. La segunda fase es el aislamiento como tal del material genético, el cual requiere separar el ADN del resto de los componentes celulares lisados (membranas, organelos, proteínas, etc.). La tercera y última fase consiste en la purificación de los ácidos nucleicos de impurezas que puedan intervenir con procedimientos enzimáticos subsecuentes como lo es la amplificación por PCR (Nishiguchi *et al.*, 2002).

Extracción orgánica (Fenol-cloroformo)

La extracción orgánica ha sido por años la metodología más utilizada a nivel mundial. Dicho procedimiento consiste en el rompimiento o lisis de las membranas celulares mediante la adición de un detergente como dodecilsulfato sódico (SDS por sus siglas en inglés), un agente quelante como ácido etilendiaminotetracético (EDTA por sus siglas en inglés), una

solución amortiguadora o buffer como tri-hidroximetil aminometano (Tris) y proteinasa K (pK). Posteriormente una mezcla de fenol/cloroformo es adicionada con la finalidad de separar las proteínas del ADN. Debido a que el ADN es soluble en soluciones acuosas, cuando se centrifuga con la mezcla de fenol/cloroformo, las proteínas y los lisados celulares quedan en la fase orgánica y el ADN queda en la fase acuosa. Es una metodología útil para la recuperación de ADN de alto peso molecular, sin embargo, se recomienda utilizarla cuando las cantidades iniciales de la muestra son grandes ya que requiere la transferencia de la muestra a distintos tubos en múltiples ocasiones, lo que aumenta el riesgo de perderla y de contaminarla (Buttler, 2011; Hebda, 2013).

Extracción por Chelex

La extracción por Chelex es una metodología rápida que involucra pocos pasos, lo que evita en gran medida el riesgo de contaminación y pérdida de la muestra. La resina quelante (Chelex 100™) es una resina de intercambio iónico compuesta por copolímeros divinilbenceno estireno que se encargan de secuestrar iones metálicos polivalentes como lo es el magnesio. Debido a que el magnesio es el cofactor de las enzimas encargadas de degradar el ADN (ADNasas), cuando éste se encuentra secuestrado, dichas enzimas se encuentran inactivadas y el ADN se encuentra protegido de la degradación. La muestra se coloca en una solución al 5% de Chelex, en ebullición por unos minutos, lo que va a lisar las membranas celulares, destruir las proteínas celulares y desnaturalizar el ADN (Buttler, 2011). El ADN obtenido a partir de ésta extracción presenta la ventaja de que durante el procedimiento se eliminan algunos de los inhibidores de PCR (Buttler, 2005)

Extracción con sílice o sílica.

Un método de extracción que elimina inhibidores de PCR es aquel que utiliza partículas de sílica y sales caotrópicas. Su fundamento está basado en que el ADN se une a la sílica cuando se encuentra en condiciones salinas altas. Los iones positivamente cargados de las sales caotrópicas, se unen con el oxígeno negativamente cargado de la sílica formando un puente iónico que permite al ADN (negativamente cargado) unirse con la sílica. Una vez que el ADN se encuentra unido con la sílica, ésta se puede lavar varias veces para eliminar las proteínas y otros componentes celulares, incluyendo algunos inhibidores de PCR. Para separar el ADN de la sílica, basta con adicionar una solución baja en sales para que las moléculas del agua se asocien con la sílica y se rompa la unión que tiene con el ADN (Hebda, 2013). Utilizar sales caotrópicas en la extracción de ADN resulta ventajoso ya que son capaces de disolver cápsulas ricas en lípidos, envoltorios celulares, desnaturalizar proteínas e inactivar nucleasas. Por éstas características la extracción con sílica es la mayormente utilizada en la actualidad (Van Pelt *et al.*, 2008).

Extracción con perlas magnéticas

Éste método utiliza una resina con perlas o partículas magnéticas, las cuales se van a unir al ADN de manera similar que a la sílica en una solución con pH superior a 7.5. Un magneto es

usado para mantener la resina unida al ADN a un costado del tubo dejando las impurezas en la fase acuosa, las cuales pueden ser removidas con facilidad. Posteriormente las perlas magnéticas unidas al material genético pueden ser lavadas para eliminar el resto de los componentes celulares y las impurezas. Para separar el ADN de las perlas magnéticas es necesario calentar la solución por algunos minutos (Buttler, 2009).

Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN resulta un paso de vital importancia, ya que una vez aislado y purificado el material genético, además de ADN humano se puede encontrar presente ADN bacteriano, fúngico, o de cualquier otra especie; es por ello que en la cuantificación se buscan metodologías que permitan cuantificar únicamente el ADN de interés presente en la muestra. Además de que se buscan encontrar las cantidades ideales de ADN que se deben utilizar para la obtención de perfiles genéticos de STR's, donde generalmente se utilizan entre 0.5 y 2.0 ng de ADN (Buttler, 2011) esto debido a que en 1 ng de ADN se encuentran aproximadamente 303 copias de cada locus que se busque amplificar (Buttler, 2009).

Espectrofotometría ultravioleta

Uno de los primeros métodos que fueron utilizados para determinar el número total de ácidos nucleicos en una muestra fue la espectrofotometría por luz ultravioleta (UV). Ésta técnica basa su fundamento en que cualquier solución que tenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene. En una celda de un espectrofotómetro un haz de luz atraviesa la solución de ácidos nucleicos y cuando ha pasado por la muestra un fotoreceptor mide la intensidad de luz absorbida. Mientras más luz absorba la muestra (absorbancia) mayor será la concentración de los ácidos nucleicos (ver Fig. 5) (Salazar *et al.*, 2011).

Los nucleótidos de ADN y ARN presentan su absorción máxima a una longitud de onda de 260nm, medición que puede ser utilizada para estimar la cantidad de ADN en una muestra, mientras que la relación de la medición de las absorbancias a 260 y 280nm (A260/A280) nos dará la pureza del ADN, esto debido a que la primera medición es la absorbancia del ADN mientras que la segunda de las proteínas, lo que permite la discriminación entre ADN y residuos peptídicos (Goodwin *et al.*, 2011). Es una técnica poco utilizada en los laboratorios forenses, ya que tiene relativamente poca sensibilidad, no determina únicamente la cantidad de ADN humano, no diferencia entre el ARN y ADN o entre ADN de buena calidad o degradado. Es una técnica que puede sufrir la interferencia de absorción de biomoléculas y otros materiales como proteínas, fenol y colorantes de ropa que son arrastrados durante la extracción de ADN y que pueden dar falsos positivos (Lee *et al.*, 2014; Buttler, 2011).

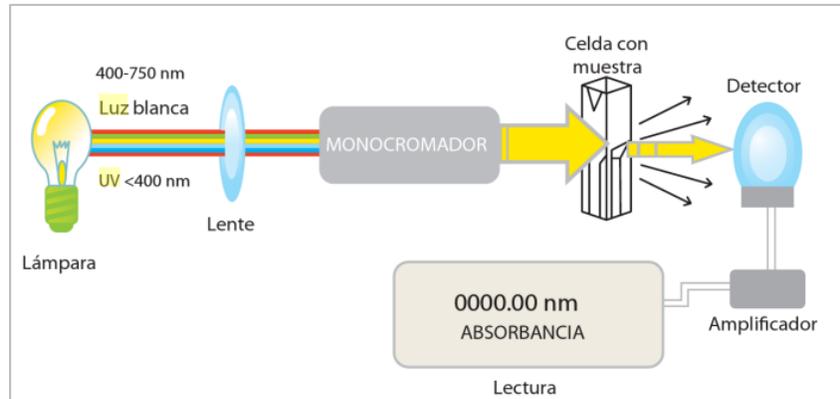


Figura 5. Fundamento del funcionamiento del espectrofotómetro. La luz UV es emitida por una lámpara que a través de un condensador dirige los rayos hacia la muestra, ubicada dentro de una celda de cuarzo. La luz será absorbida de manera proporcional de acuerdo a la concentración de la muestra. La luz que no es absorbida por la muestra es medida por el detector, restándola a la luz inicial emitida, generando así una lectura en unidades de absorbancia que oscila entre 0.001 a 1.000 (Tomado de Salazar *et al.*, 2011).

Geles de agarosa

La cuantificación mediante geles de agarosa permite no solo estimar las cantidades de ADN en una muestra, sino que también permite valorar su calidad (grado de degradación); para ello las muestras son corridas mediante electroforesis en geles de agarosa (Lee *et al.*, 2014). La agarosa es un polisacárido que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente, pero que se disuelve fácilmente en temperatura de 50-60°C, se torna líquida y solidifica cuando se enfría, formando un gel altamente poroso que permite el paso de moléculas según sea su peso molecular, permitiendo la separación por tamaño de los diferentes componentes de la muestra. El tamaño de los poros de la matriz del gel depende de la concentración de agarosa utilizada y la concentración de la agarosa es inversamente proporcional al tamaño del poro obtenido; mientras más pequeño sea el poro, la migración de las moléculas será más lenta. La migración de las moléculas se lleva a cabo gracias a la carga de cada una de ellas y la velocidad de migración es debida al tamaño de cada molécula, los ácidos nucleicos más pequeños, migran con mayor velocidad hacia el ánodo que los de mayor tamaño (Salazar *et al.*, 2011).

Para permitir la visualización del ADN, al gel se le agrega un colorante fluorescente como bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante del ADN que permite la visualización del material genético bajo luz UV. En el gel se carga el ADN y un estándar de cuantificación con concentraciones y pesos moleculares conocidos, dicho estándar permite la comparación con el ADN problema. Cuando el ADN no se encuentra degradado, la migración coincide con el ADN de mayor peso molecular del estándar, pero si por el contrario, se muestran manchas a lo largo del corrimiento y franjas que coinciden con ADN de menor peso molecular, nos indica que se trata de ADN degradado. La cantidad de ADN se puede determinar por el ancho de la banda y la fluorescencia que emite comparada con la banda del estándar (ver Fig. 6) (Lee *et al.*, 2014).

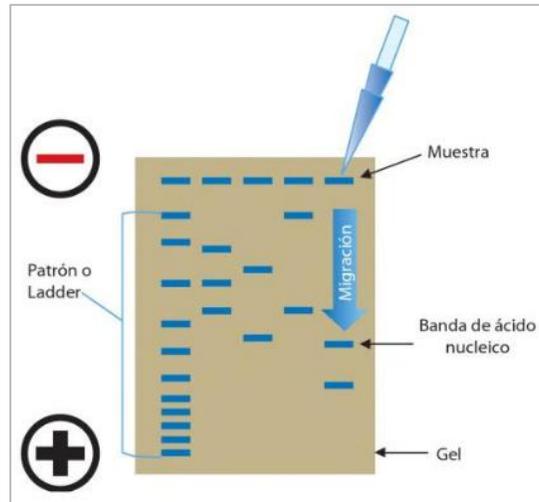


Figura 6. Electroforesis de ácidos nucleicos. Representación de un gel de agarosa en el cual se visualiza un marcador de peso molecular junto a las muestras para ayudar en la determinación de peso molecular de los fragmentos. La muestra es cargada en los pocillos y se deja correr hacia el polo positivo (Tomado de Salazar *et al.*, 2011).

PCR en tiempo real

El método de cuantificación más sensible es el PCR en tiempo real, el cual tiene el mismo fundamento que el PCR de punto final, pero su objetivo es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción, es decir, detecta los productos de amplificación en cada uno de los ciclos; de esta manera, es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra en cada uno de los ciclos de la reacción ya que los amplicones son monitoreados conforme transcurre la reacción. Es una técnica que es altamente sensible aun teniendo cantidades muy pequeñas de templado o ADN (Tamay de Dios, *et al.*, 2013). Es una metodología con la cual se puede cuantificar de manera absoluta o relativa el material genético de una muestra (Van Pelt *et al.*, 2008).

El uso de sondas hidrolíticas conocidas como sondas TaqMan permite la cuantificación absoluta del material genético, para ello se utilizan dos fluorocromos que se emiten a diferentes longitudes de onda. Ésta cuantificación se basa en la propiedad de nucleasa 5' de la Taq polimerasa (TaqMan). La sonda con los fluorocromos hibrida en una región interna del amplificado, el fluorocromo reportero, se une al extremo 5', mientras que el fluorocromo denominado apagador se une al extremo 3', cuando ambos fluorocromos se encuentran cerca, no hay fluorescencia, pero cuando la ADN polimerasa corta al fluorocromo reportero y éste se aleja del apagador, comienza a emitir fluorescencia que es registrada por el equipo (ver Fig. 7) (Buttler, 2009; Van Pelt *et al.*, 2008).

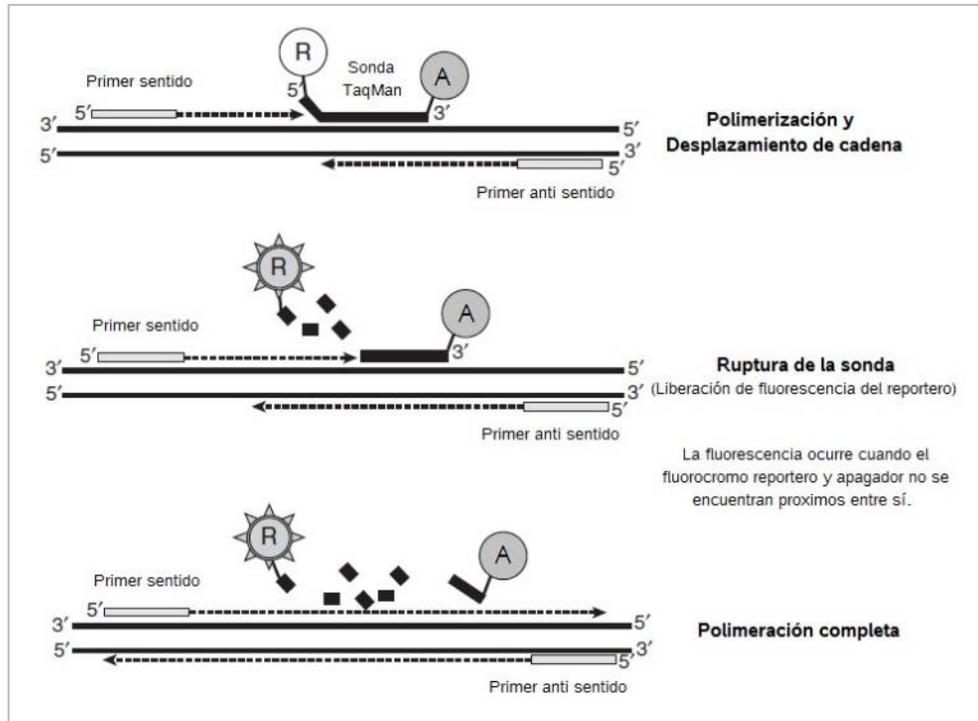


Figura 7. Representación del ensayo por sondas TaqMan. Se muestra el fundamento de las sondas TaqMan utilizadas en la cuantificación por PCR tiempo real (Tomado y modificado de Buttler, 2009).

También se pueden utilizar colorantes o fluoróforos intercalantes como el SYBR Green o el bromuro de etidio que resultan ampliamente específicos para ADN de doble cadena, sin embargo, aquí la cuantificación será relativa porque el colorante se va a intercalar en todo el ADN presente en la muestra, es decir, no hay discriminación entre el ADN nuclear o mitocondrial, o si es de alguna otra especie que no sea la de interés, dando como resultado valores de cuantificación quizá un poco mayores a los realmente contenidos en la muestra (Buttler, 2009; Van Pelt *et al.*, 2008)

Amplificación de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de ADN blanco que es copiada fielmente durante varios ciclos. Para que se lleve a cabo la reacción son necesarios los siguientes elementos: el templado o molde (ADN), la enzima ADN polimerasa, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg^{+}) como cofactor de la enzima, una solución amortiguadora o buffer y H_2O (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Es una técnica análoga al proceso de replicación celular, donde se busca la generación de una nueva cadena de ADN complementaria basada en una existente; dicho cometido se logra mediante cambios de

temperatura y la actividad enzimática de la ADN polimerasa. La simplicidad de la reacción y la relativamente fácil manipulación con muy pocos pasos la ha convertido en una técnica pilar no solo en la genética forense, sino en todos los trabajos de biología molecular (Rapley y Whitehouse, 2007).

El protocolo de amplificación típicamente consta de cuatro fases principales: Una fase inicial en donde se busca activar la ADN polimerasa, ésta fase dura de 2-10 minutos a temperaturas de 90-95°C. Una segunda fase en donde se lleva a cabo la amplificación, la cual implica un programa específico de termociclado. Posteriormente se lleva a cabo la fase de extensión, con la finalidad de completar la amplificación de los millones de copias de ADN presentes, dicha etapa consiste de 5-10 minutos a 70-75°C. La fase final es de enfriamiento, en donde se busca igualar las condiciones ya sea de temperatura ambiente o de refrigeración (4°C) para almacenaje temporal de las muestras antes de su posterior procesamiento (Van Pelt *et al.*, 2008). Sin duda la fase más importante es la de amplificación, la cual a su vez consiste en tres pasos subsecuentes.

Desnaturalización. Las cadenas de ADN son separadas mediante el aumento de temperatura a 95°C, donde el tiempo va a depender de la secuencia del templado, si la cantidad de G-C es alta, es necesario más tiempo para romper los enlaces que unen a dichas bases, comparado con los templados ricos en A-T que requieren de menor tiempo de desnaturalización (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Hibridación o alineamiento. Los primers se van a alinear al extremo 3' del templado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que la unión templado-primer se lleve a cabo es necesaria una temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) la cual generalmente oscila entre los 50-60°C (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Extensión. La enzima actúa sobre el complejo templado-primers y realiza su actividad catalítica: agrega dNTPs complementarios para crear las cadenas completas de ADN, en dirección 5' a 3'. La temperatura óptima de la reacción es de 72°C (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

En la genética forense la mayoría de los sistemas de identificación actuales utilizan PCR multiplex como parte de sus metodologías, es decir, en una misma reacción son amplificados todos los marcadores genéticos contenidos en el kit, para ello en la mezcla de reacción se incluye cada par de primers perteneciente a cada uno de los marcadores. Sin embargo, para que la reacción se lleve a cabo de manera adecuada, es necesario que las temperaturas de alineamiento de los primers sean similares, además de que se deben evitar regiones de excesiva complementariedad entre los primers, esto para evitar la formación de dímeros que eviten su unión al ADN (Buttler, 2011).

Un aspecto de vital importancia es que el ADN a amplificar debe estar libre de inhibidores que intervengan o imposibiliten la reacción, es por ello que los métodos de extracción de ADN son de gran importancia, ya que el éxito o fracaso de la reacción de amplificación

dependerá de una buena o mala extracción y purificación del material genético. Esencialmente debe estar libre de nucleasas que degraden el templado de ADN y el amplificado del mismo, libre de endo- y exo-proteasas que inactiven el ADN termoestable dependiente de la ADN polimerasa mediante digestión, libre de proteínas de unión al ADN que estabilicen la estructura de doble hélice interfiriendo así con el desenrollamiento del material genético, la unión de los primers y por tanto con toda la reacción (Van Pelt *et al.*, 2008).

La mayoría de los inhibidores de PCR interaccionan directamente con el ADN, o interfieren con la enzima encargada de la reacción, ya sea bloqueando su actividad enzimática o evitando la unión con su cofactor que es el magnesio (Mg^{2+}). Muchos de los inhibidores son componentes propios de la célula o la muestra, ejemplo de ello es la presencia de glucoproteínas y ácidos grasos que obstruyen físicamente o inhiben enzimáticamente a la polimerasa; el colágeno, la melanina, la mioglobina y las proteinasas, son algunos otros ejemplos de inhibidores. Sin embargo, muchos inhibidores pueden no ser componentes propios de la célula, sino que son agentes que se utilizan durante la extracción del ADN: el exceso de sales como KCl o NaCl, detergentes iónicos como el SDS, la presencia de etanol, isopropanol, fenol entre otros (Bessetti, 2007).

Existen distintas opciones que pueden evitar los efectos de los inhibidores que no fueron eliminados durante la extracción del ADN, como la elección de la polimerasa, incrementar su concentración en la reacción, utilizar aditivos como albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) que incrementen la resistencia a inhibidores o disminuyendo la cantidad de templado de ADN que se agregue a la reacción, pueden ser soluciones útiles para que la PCR pueda llevarse a cabo (Bessetti, 2007).

Genotipificación del ADN

Para analizar el ADN es necesaria su genotipificación, hoy en día, la mayoría de los laboratorios forenses utilizan electroforesis capilar (EC) para la detección y el análisis de los STRs, marcadores mayormente utilizados en la identificación de personas. Sin embargo, se han desarrollado metodologías más rápidas y más exactas al uso de la EC, las cuales se utilizan principalmente para el análisis de SNPs o ADNmt. A continuación, se describen algunas metodologías que permiten la detección y el análisis del ADN utilizadas en laboratorios de genética forense.

Electroforesis capilar (EC)

Como anteriormente se mencionó, es la principal metodología utilizada para separar y detectar los alelos de los STR en los laboratorios forenses de ADN, ya que permite que se lleven a cabo tres condiciones que resultan necesarias para lograr tipificaciones confiables de los STR. La primera es la resolución espacial, la cual es requerida para separar los alelos

de los STRs que difieran en tamaño por un solo nucleótido. La segunda es la resolución espectral, esto para separar los fluorocromos unos de otros, de manera que los productos de PCR de los loci marcados con los fluorocromos se puedan diferenciar. Por último, se requiere de la precisión de tamaño de ADN, la cual debe ser consistente, para ello la calibración debe estar dada por la relación con escaleras alélicas; condiciones que se logran en la EC (Buttler, 2011).

Para llevar a cabo la EC, se requiere de un capilar de vidrio con un diámetro interno de 50µm aproximadamente, conectado en sus extremos a electrodos de alto voltaje. Se requiere de un láser como fuente de excitación de los fluorocromos, un detector de fluorescencia y una computadora con software capaz de analizar los resultados. La EC basa su fundamento en la electroforesis en gel, es una metodología en la que se busca la separación de moléculas de acuerdo a su carga y tamaño, con algunas pequeñas diferencias: en lugar de la matriz de gel, la EC utiliza un polímero viscoso, a través del cual migran los fragmentos de ADN por el capilar hacia el electrodo positivo. Los fragmentos más grandes se moverán más lento a través del capilar que los fragmentos pequeños, permitiendo así su separación por tamaño y debido a que en la EC se utilizan campos eléctricos mucho más fuertes (de 10 a 100 veces), los tiempos de corrida son mucho menores a los de la electroforesis en gel. Un aspecto de vital importancia en la EC es que el ADN que desea analizarse debe estar desnaturalizado (de una sola hebra), para que, al momento de la detección por láser, únicamente se detecte la señal de una cadena y no una señal repetida que complique la lectura de los resultados. Para ello se ha optado por el uso de la formamida de alta calidad con una baja conductividad para que no afecte el corrimiento electroforético, la formamida es adicionada a la muestra para que el ADN se desnaturalice antes de iniciar el corrimiento electroforético. La detección de la muestra en la EC se lleva a cabo mediante un láser colocado en una ventana al final del capilar. Las moléculas más pequeñas llegan primero al punto de detección seguidas de las de gran tamaño, éste orden de migración es correlacionado con la longitud o el número de pares de bases. Los datos recabados se trazan en función de la intensidad de fluorescencia relativa observada de las moléculas que pasan por el detector (ver Fig. 8) (Buttler, 2011).

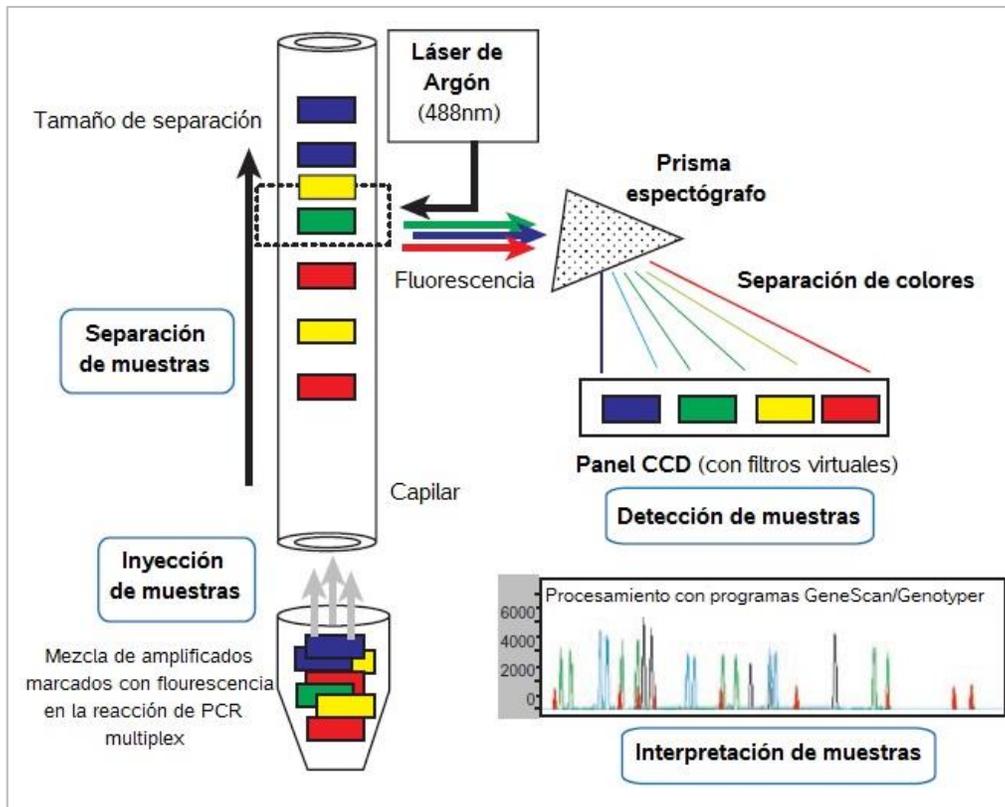


Figura 8. Funcionamiento de la Electroforesis Capilar. Se esquematizan los pasos en la EC, desde la inyección de la muestra en el capilar, la separación de las moléculas, la lectura por el láser, la detección por la cámara, así como la interpretación de las muestras (Tomado y modificado de Buttler, 2011).

Secuenciación

Los métodos de secuenciación de ADN más utilizados se basan en el método enzimático descrito por Sanger en 1977. Esta técnica se basaba originalmente en la extensión específica de la cadena de ADN a partir de un primer, mediante la acción de la ADN polimerasa que incorpora dNTPs en la cadena en formación. A la mezcla de reacción se le agregan ddNTPs que carecen de un residuo -OH en la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos son incorporados por medio del trifosfato presente en posición 5', pero al carecer del hidroxilo en la posición 3' no pueden formar enlaces fosfodiéster con nucleótidos sucesivos y la cadena queda interrumpida. La técnica original consiste en realizar cuatro reacciones de polimerización diferentes, en las cuales debe incluirse el fragmento de ADN que se desea secuenciar, dNTPs convencionales que sí llevan el residuo -OH en posición 3' y los ddNTPs. La diferencia entre las cuatro reacciones es que cada una de ellas lleva una base nitrogenada distinta (ddATPs, ddTTPs, ddCTPs y ddGTPs). De este modo, los dNTPs y los ddNTPs compiten entre ellos generando poblaciones de oligonucleótidos terminados en A, C, G o T. Los fragmentos obtenidos, que difieren en la última base, se separan mediante electroforesis en gel. Posteriormente la secuencia se determina leyendo el gel de abajo hacia arriba y de esta manera se logra conocer la secuencia del fragmento original (Peral *et al.*, 2015).

Actualmente, la secuenciación se realiza en equipos automatizados que utilizan los mismos principios básicos establecidos por Sanger pero emplean los cuatro ddNTPs en una misma reacción, los cuales se diferencian porque son marcados con fluorocromos de distinto color que luego de ser excitados por un láser, son leídos para que puedan ser detectados por el equipo. De esta manera los secuenciadores automáticos generan un electroferograma de cuatro colores en el que cada pico representa a cada una de las cuatro bases del ADN (ver Fig. 9) (Peral *et al.*, 2015). Es una metodología utilizada para confirmar y buscar nuevas mutaciones, es un método molecular de alta resolución, sin embargo, requiere de una inversión grande por los altos costos que la técnica implica.

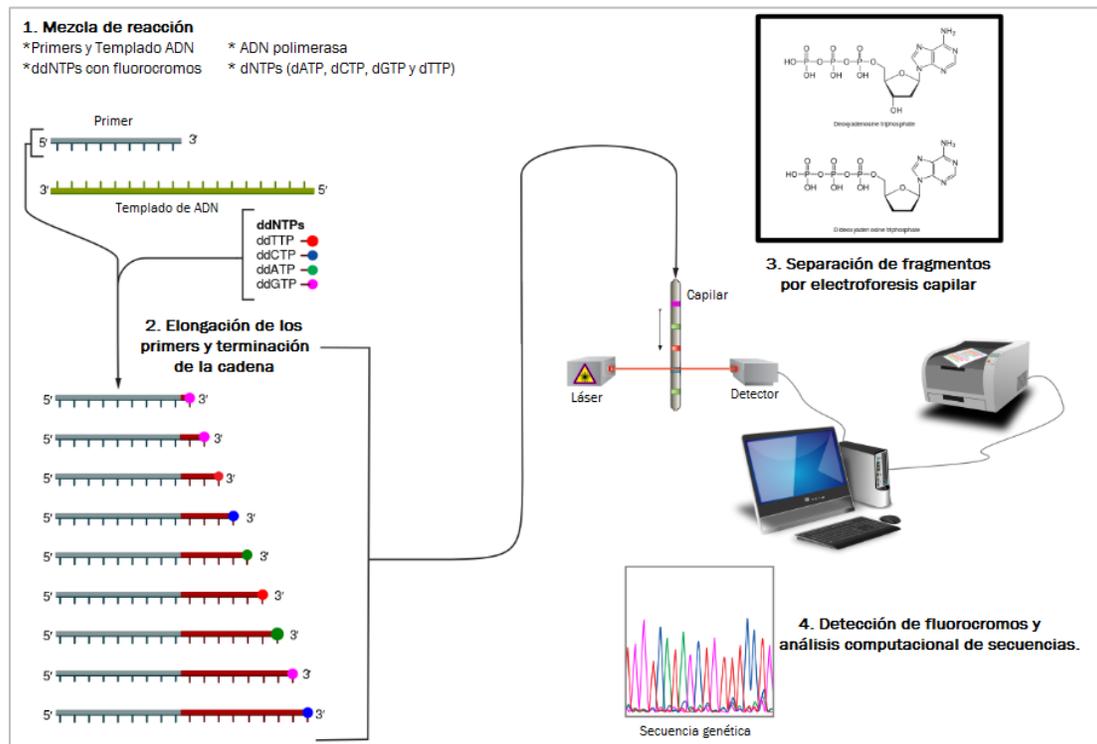


Figura 9. Secuenciación Sanger automatizada. Se esquematizan los pasos de la secuenciación Sanger, desde el marcaje del ADN en PCR, hasta el análisis en electroforesis capilar para la obtención de la secuencia genética (Tomado y modificado de suggest-keywords.com).

Pruebas estadísticas

La estadística proporciona al investigador un conjunto de herramientas de análisis que le permiten resumir y describir la información sobre determinadas características de interés de los individuos u objetos de estudio, además de que permite hacer inferencias y extraer conclusiones sobre una población a partir de los resultados obtenidos en una muestra (Moncho, 2015). El aspecto más importante de la estadística es la obtención de conclusiones basadas en los datos experimentales, a este proceso se le conoce como inferencia estadística, la cual comprende dos partes principales: la estimación de parámetros y la prueba o contraste de hipótesis. Una hipótesis estadística es una afirmación con respecto a alguna característica desconocida de una población de interés. El objetivo de probar una hipótesis estadística es el decidir si la afirmación se encuentra apoyada por la evidencia experimental que se obtiene a través de una muestra aleatoria y la decisión acerca de si los datos muestrales apoyan estadísticamente la afirmación se toma con base en la probabilidad, la cual si es mínima entonces será rechazada (Canavos, 1988).

Para que una prueba estadística sea válida se necesitan ciertas condiciones que especifiquen el modelo y el requisito de medida. Dichas condiciones son los llamados supuestos de la prueba, los cuales en estadística paramétrica son los siguientes (Juez y Diez, 1997):

1. Las observaciones deben ser independientes entre sí.
2. Las observaciones deben hacerse en poblaciones distribuidas normalmente.
3. Estas poblaciones deben tener la misma varianza (o en casos especiales deben tener una proporción de varianzas conocida).

Para la comprobación de dichos supuestos se utilizan recursos gráficos y analíticos que permitan saber el comportamiento de los datos a trabajar (Moncho, 2015):

- **Criterios gráficos:** Histogramas y gráficos Q-Q normal para la variable cuantitativa, gráficos comparativos de cajas (box-plots) y diagramas de dispersión de la variable cuantitativa o gráficos de secuencia.
- **Criterios analíticos:** Prueba de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de test de Shapiro-Wilk o la prueba de Lilliefors) o contraste ji-cuadrado de bondad de ajuste para comprobar la hipótesis de normalidad y la prueba de Levene para comprobar la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

Cuando estas condiciones se satisfacen con los datos de análisis se escoge una prueba paramétrica como la T de Student o la F de Fisher para el análisis de datos, pero cuando no se cumplen estas condiciones se utilizan pruebas no paramétricas que permiten obviar estas condiciones (Juez y Diez, 1997). El incumplimiento de los supuestos estadísticos de las pruebas paramétricas, sobre todo la normalidad, es más fácil que ocurra en muestras pequeñas, menores a 30 casos y es recomendable utilizar pruebas no paramétricas o de distribución libre (Álvarez, 2007).

Muchos de los métodos paramétricos funcionan bien cuando la normalidad se puede suponer aproximadamente. Por su parte, los no paramétricos son casi tan capaces de detectar diferencias entre poblaciones como los paramétricos cuando se cumplen todos los supuestos y cuando no se cumplen a menudo son más potentes en hacerlo. Es por ello que en muchas ocasiones se prefieren utilizar las pruebas no paramétricas frente a sus análogas pruebas paramétricas (Wackerly *et al.*, 2008).

Prueba de Kruskal-Wallis

La prueba H de Kruskal-Wallis es la alternativa no paramétrica al modelo ANOVA de una vía para comparar más de dos grupos independientes, siempre que por lo menos se encuentren disponibles mediciones ordinales y las distribuciones de las poblaciones de interés sean continuas. Es una prueba recomendable para aquellos problemas en los que los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas no se cumplen, toma en consideración los rangos de las observaciones y no solamente la posibilidad de que estos sean inferiores o superiores a la mediana. Es indicada para la comparación de una variable cuantitativa en tres o más grupos cuando las muestras son independientes (Canavos, 1988; Moncho, 2015) Es un estadístico con una distribución aproximada a la χ^2 con $k-1$ grados de libertad, por lo que la significancia del valor calculado de H se verifica con tablas de χ^2 (Gibbons y Chakraborti, 2003).

Los supuestos básicos que sustentan la prueba son:

- a) Las k muestras son aleatorias
- b) Las k muestras son independientes
- c) Las variables observadas son continuas
- d) La escala de medición es al menos ordinal

La hipótesis nula y alternativa se plantean como sigue a continuación:

H_0 : Las medianas de las k muestras son iguales

H_a : De las k poblaciones al menos una tiene la mediana distinta

El estadístico para ésta prueba se denota con la letra H :

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

Donde:

- k es el número de grupos
- n_i es el tamaño de la i -ésima muestra
- $N = \sum_{i=1}^k n_i$ es el total de observaciones
- $R = \sum_{j=1}^k R_{ij}$ es la suma de rangos del grupo i -ésimo

Prueba Post Hoc

Si se acepta la H_0 no cabe más análisis debido a que las medianas poblacionales presentan un promedio equivalente. Sin embargo, si se rechaza la H_0 , es conveniente determinar cuál o cuáles son las poblaciones que difieren de las demás. Para ello existen métodos basados en la comparación a posteriori entre pares de submuestras, hasta llegar a especificar exactamente entre qué poblaciones existen diferencias. La prueba de Tukey es la más utilizada pues controla de mejor manera los errores ampliamente conocidos en la estadística (α y β). Dicha prueba permite hacer todas las posibles comparaciones de tratamientos de dos en dos (Rial y Varela, 2008; Wong, 2010). La prueba no paramétrica de Siegel-Tukey para la igualdad en la variabilidad permite comparar la diferencia en los valores absolutos entre la media de los rangos. Las hipótesis de la prueba se plantean como sigue a continuación:

H_0 : La variabilidad de x es igual entre los dos grupos

H_a : La variabilidad de x es diferente entre los dos grupos

Utiliza un valor crítico de comparación que es un z-score (medida estadística que cuantifica la distancia) corregido por el número de comparaciones que se hacen y una constante basada en el tamaño muestral total y el tamaño muestral de los grupos que se comparan teniendo así (Gibbons y Chakraborti, 2003):

$$|R_i - R_j| \geq Z_{\alpha/k(k-1)} \sqrt{\frac{N(N+1)}{2} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

Donde:

- k es número de grupos
- n_i es el tamaño de la i -ésima muestra
- $N = \sum_{i=1}^k n_i$ es el total de observaciones
- $R = \sum_{j=1}^k R_{ij}$ es la suma de rangos del grupo i -ésimo

JUSTIFICACIÓN

Las ciencias forenses al tratarse de un campo multidisciplinario, en muchas ocasiones obliga a distintas áreas a trabajar en conjunto para lograr mejores resultados, ejemplo de ello son las áreas de patología y genética. Sin embargo, una gran problemática es el procesamiento de las muestras que se tienen en común como es el caso de los tejidos blandos con diferentes fines. En el análisis histopatológico lo primordial es conservar la histología del tejido, para lo cual se utilizan fijadores que logran dicho cometido pero que dañan en gran medida proteínas, enzimas y sobre todo el ADN, lo que representa dificultades cuando dichos materiales deben ser empleados para la obtención de perfiles genéticos, ya que esto imposibilita la recuperación de los mismos.

Existen múltiples maneras en que ha sido atendido este problema, la mayoría de ellas están basadas en métodos de extracción más eficientes en donde se busca la mayor recuperación de ADN, sin embargo, son alternativas que no resuelven el problema de la degradación. Una óptica diferente es atender el problema desde su origen, es decir, generando procedimientos que no dañen o deterioren el ADN.

De forma regular se han utilizado distintos fijadores que en su mayoría son a base de alcoholes o aldehídos que, si bien preservan la histología del tejido y dañan el ADN, en otros casos conserva la estructura del ADN, pero no la estructura del tejido.

Se ha observado que el uso del PEG en la conservación de tejido con fines de plastinación desarrollados en el INCIFO confiere resistencia y consistencia susceptible para ser empleado como método de fijación. El PEG es un polímero que debido a sus características químicas ha sido reportado como un agente deshidratante que no causa encogimientos drásticos de la membrana de los tejidos (Sriramachari y Ramalingaswami, 1952) y debido a que ha sido utilizado como medio de inclusión (Smithson *et al.*, 1983; Gao y Godkin, 1991), se puede pensar que es una sustancia capaz de preservar la histología del tejido, además de que al tratarse de un polímero, cuando entra en contacto con los tejidos, no genera enlaces cruzados, dimerizaciones o puentes de hidrógeno entre las moléculas de la célula que propicien su degradación. De ahí el supuesto que el PEG puede funcionar como un fijador que cumpla con los requerimientos histopatológicos (buena fijación y afinidad en las tinciones histológicas) y genéticos (conservación del ADN), y que de ésta manera ambas disciplinas puedan utilizar la misma muestra para los fines de cada una. Esto representa una gran ventaja ya que, en las Ciencias Forenses, muchas veces se trabajan con muestras únicas, mínimas o críticas, con las cuales se debe dictaminar en todas las áreas, por lo que es de vital importancia que el tratamiento de las mismas no represente problemas para las distintas disciplinas en que se requiere su manejo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Utilizar al polietilen glicol (PEG) en la fijación de los tejidos blandos de cadáveres que serán preservados en bloques de parafina y utilizados en las áreas de patología y genética con fines de análisis histopatológico y de identificación humana

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar tinciones utilizadas en el área de patología a partir de tejidos en bloques parafinados que hayan sido fijados en PEG y compararlos contra los fijados en formol y determinar si existen diferencias en la conservación histológica del tejido.
- Obtener perfiles genéticos a partir de bloques parafinados de tejidos fijados en PEG y compararlos contra los fijados en formol.
- Comparar el proceso de fijación de tejidos blandos entre el formol y el PEG, las ventajas y desventajas de cada uno en el área de genética forense (cantidad y calidad de ADN, obtención de perfiles genéticos completos o parciales) y en el área de patología (calidad de cortes, conservación de la histología, tinciones histológicas).
- Estandarizar e implementar una técnica que utilice el PEG en el proceso de fijación de tejidos que resulte útil para las áreas de genética y patología forense.

MATERIAL Y MÉTODO

Toma de muestra

Se seleccionó un cadáver (Cadáver 1) ingresado al Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) del Tribunal Superior de Justicia de la Ciudad de México en calidad de occiso desconocido, el cual no presentaba signos de putrefacción, degradación o descomposición avanzada, se le tomó muestra de un fragmento del músculo oblicuo externo de aproximadamente 25 cm² y 0.5 cm de grosor. La muestra se limpió del excedente de grasa que tenía adherido al músculo y posteriormente se fraccionó en 12 porciones más pequeñas de igual tamaño (Fig. 10).

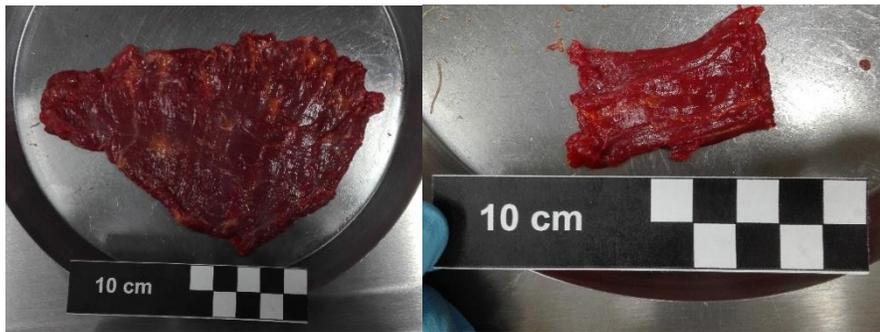


Figura 10. Músculo oblicuo externo. Fragmento total de músculo sin grasa que se tomó del cadáver 1 (izq.) y fragmento que fue puesto en algún tratamiento de fijación (der.).

Se seleccionaron cuatro cadáveres (Cadáveres 2-5) ingresados al Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) del Tribunal Superior de Justicia de la Ciudad de México en calidad de desconocidos, que no presentaban signos de putrefacción, degradación o descomposición avanzada; a cada uno de los cadáveres se le tomó muestra de los siguientes órganos: corazón, encéfalo, hígado, músculo (oblicuo externo), páncreas, pulmón y riñón. El fragmento de muestra tomado fue de aproximadamente 10 cm². Cada uno de los órganos se limpió del excedente de sangre y se cortaron dos fragmentos de aproximadamente 5 cm² con un grosor no mayor a 1 cm (Fig. 11).



Figura 11. Fragmentos de encéfalo. Se muestran dos fragmentos de encéfalo listos para el proceso de fijación.

Proceso histológico

Fijación de tejidos

Para la fijación de los tejidos se utilizaron dos tratamientos:

Tratamiento 1 (T1): Formol 10%

Tratamiento 2 (T2): 1.4 L de polietilen glicol 6000, 1 L de etanol 96% y 150 ml de formol10%.

La mitad de los 12 fragmentos de músculo pertenecientes al cadáver 1 fueron puestos en fijación en el T1, mientras que la otra mitad fue fijada en el T2, cada fragmento fue fijado a distintos tiempos 6, 24, 48 horas, 5, 10 y 15 días*.

De las muestras de tejido pertenecientes a los cadáveres 2-5, uno de los dos fragmentos de cada órgano, se fijó en el T1 y el otro fragmento fue fijado en el T2 durante 24 horas en ambos casos*.

*Para evitar contaminaciones, cada tejido fue colocado en un frasco de 50 ml estéril y para asegurar que la fijación fuera la adecuada, se agregaron 30 ml del tratamiento fijador correspondiente, cubriendo la totalidad de la superficie del tejido (Fig. 12).

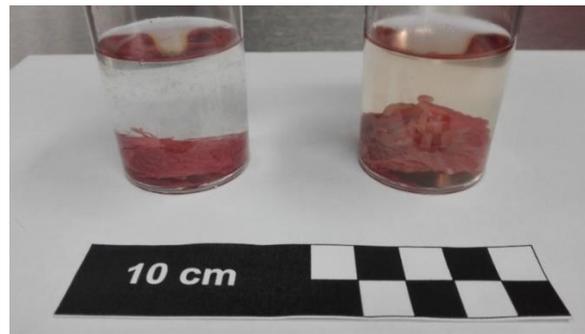


Figura 12. Tejidos en fijación. Se observa una muestra de tejido muscular en los dos tratamientos de fijación Tratamiento 2 (izq.) y Tratamiento 1 (der.) Tiempo de fijación 00 horas.

Deshidratación e inclusión de los tejidos en bloques de parafina

Una vez fijado el tejido, con ayuda de bisturí se cortó un fragmento de aproximadamente 2 cm² con un grosor no mayor a 0.5 cm, el cual se colocó en un casete de plástico. Posteriormente los tejidos fueron sometidos a un proceso de deshidratación como se describe a continuación: 2 horas en etanol al 60%, 4 horas en etanol al 70%, 4 horas en etanol 96%, 4 horas en etanol absoluto, 2 horas en etanol absoluto y xilol 50:50, 2 horas en xilol y 4 horas en parafina, en el equipo Spin Tissue Processor Microm STP 120 (Thermo Scientific™). Cuando los tejidos ya se encontraban deshidratados, se procedió a su inclusión en parafina (marca Tissue-tek) con punto de fusión de 56-58°C en el Centro de Inclusión de tejidos modular EC 350 para bloques de parafina (Myr™).

Tinciones histológicas

Se realizaron cortes de 3 μ m de espesor de cada uno de los tejidos incluidos en bloque de parafina, los cortes fueron colocados en un portaobjetos donde se llevó a cabo un proceso de desparafinado que consistió en colocar los portaobjetos en estufa a 65°C durante 30 minutos. Una vez eliminada la parafina se procedió a hidratar el tejido mediante 2 cambios de xilol, 2 cambios en etanol absoluto, 2 cambios en etanol 96% y un cambio en agua. Cada cambio consistió en el sumergimiento de las preparaciones por al menos 30 segundos en cada alcohol. Posteriormente se realizaron las tinciones a continuación descritas:

Hematoxilina-Eosina (H-E). Se sumergió la preparación en Hematoxilina durante 10 minutos, se realizó un lavado con agua para eliminar el exceso de la hematoxilina, posteriormente se realizaron de 8-9 baños rápidos (2 seg. c/u) en Eosina y finalmente se volvió a lavar la preparación con agua.

Tinción de Schiff (PAS). Se sumergió la preparación en Ácido peryodico 0.5% durante 10 minutos, se lavó la preparación con agua para posteriormente sumergirla en reactivo de Schiff por 15 minutos, nuevamente se realizó un lavado ésta vez con agua tibia (35°C).

Tinción Ziehl-Neelsen (Z-N). Se sumergió la preparación en Fucsina durante 5 minutos, se realizó un lavado con agua, posteriormente se sumergió en Azul de metileno durante minuto y medio, se realizó otro lavado para después pasar la preparación por un baño de Alcohol ácido, para finalizar se volvió a lavar con agua.

Tricrómica de Masson. Se sumergió la preparación en solución de Bouin durante 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con agua y después se sumergió en Hematoxilina férrica de Weigert durante 15 minutos, se realizó otro lavado para enseguida sumergir en Ácido fosfomolibdico durante 15 minutos, nuevamente se lavó la preparación para eliminar el exceso de ácido, para después sumergir la preparación en azul anilina durante 5 minutos finalizando con otro lavado con agua.

Tinción Gram. Se sumergió la preparación en Violeta de Genciana o cristal violeta durante 1 minuto, enseguida se sumergió en Yodo Gram durante 1 minuto y durante 1 minuto más en Safranina. Posteriormente se lavó la preparación con agua, después se sumergió la preparación en una solución etanol-acetona [50:50] durante 1 minuto. Para finalizar se realizó otro lavado con agua.

Una vez realizadas las tinciones se rehidrataron los tejidos con un cambio en agua, 2 cambios en etanol 96%, 2 en etanol absoluto y 2 cambios en xilol, posteriormente el tejido fue cubierto con resina sintética y cubreobjetos. Se dejó secar la resina a temperatura ambiente durante un día y posteriormente las preparaciones fueron observadas en microscopio óptico.

Análisis del ADN

Extracción y purificación de ADN

Muestra de referencia (Tejido fresco)

Se tomaron 50 mg de tejido fresco (Fig. 13), y con ayuda de un bisturí se cortó el tejido en fragmentos lo más pequeños posibles, esto con el fin de facilitar la lisis.



Figura 13. 50 mg de tejido muscular. Se muestra el fragmento de tejido fresco que se tomó para realizar la extracción de ADN.

La muestra fue colocada en un tubo de microcentrifuga de 1.7 ml, se adicionaron 250 μ l de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 2%), 10 μ l de proteinasa K [10 mg/ml] y 3 μ l de DTT [0.1 M] por 30 minutos a 65°C con 1100 rpm.

Una vez finalizada la lisis, se centrifugó la muestra por 2 minutos a 13,500 rpm, posteriormente se recuperaron 200 μ l de lisado a los cuales se le agregó 600 μ l de Buffer PB (QIAGEN®) y 15 μ l de sílica gel. Se homogenizó la muestra mediante el uso de vortex por 15 segundos y se centrifugó por un minuto a 12,000 rpm.

Se retiró el sobrenadante cuidando de no tocar el botón de sílica y se lavó la muestra con 400 μ l de Buffer PE (QIAGEN®), nuevamente se agitó la muestra en vortex hasta que el botón de sílica se homogenizara completamente y se centrifugó a 12,000 rpm durante un minuto.

Se retiró el sobrenadante cuidando de no tocar el botón de sílica y se dejó evaporar la muestra en baño seco a 60°C hasta que el botón se encontrara completamente seco. Se agregaron 50 μ l de agua estéril libre de nucleasas, la muestra se homogenizó nuevamente hasta que el botón de sílica se disolviera en el agua, para posteriormente dejarse incubar por 3 minutos a 60°C en baño seco. Se centrifugó por tres minutos a 13,500 rpm.

Se retiró el sobrenadante (ADN purificado) y fue colocado en un tubo de micro centrifuga de 1.7 ml nuevo y estéril.

Tejido fijado en formol y PEG

Se tomaron 50 mg de tejido previamente fijado, y con ayuda de un bisturí se cortó el tejido en fragmentos lo más pequeños posibles, esto con la finalidad de facilitar los lavados y la lisis. Debido a que los tejidos presentaban un exceso de fijador (Formol o PEG) se realizaron tres lavados previos a la lisis para eliminarlo.

El primer lavado se realizó con 1 ml de etanol absoluto, se agitó la muestra en vortex durante 30 segundos y posteriormente se colocó a 50°C, 1100 rpm durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 13,500 rpm durante 2 minutos. Se retiró el sobrenadante cuidando de no tocar el tejido. Posteriormente se realizaron de la misma manera dos lavados más, uno con etanol al 70% y el otro con agua estéril.

Una vez que el tejido estuvo libre del exceso del fijador, se procedió a hacer la lisis, purificación, lavado y elución del ADN, lo cual se realizó de la misma manera que para las muestras de referencia.

Bloques de parafina

Se obtuvieron 3 cortes de los tejidos incluidos en los bloques de parafina, cada una de ellas con espesor de 10 mμ. Con el fin de facilitar el proceso de desparafinado, en el tubo de microcentrifuga de 1.7 ml únicamente se colocó la parte de tejido de la laminilla, es decir, se retiró la parafina de los alrededores con ayuda de un bisturí.

Para eliminar la parafina del tejido, se realizó una desparafinación agregando 1 ml de xilol, se agitó en vortex durante 30 segundos, se centrifugó por un minuto a 13,500 rpm. Se retiró el sobrenadante (xilol con parafina) cuidando de no tocar el tejido. Con la finalidad de eliminar los remanentes de xilol, se adicionó 1 ml de etanol absoluto, se agitó y centrifugó con las mismas condiciones que para el xilol y se retiró el etanol del tubo. Para eliminar los remanentes de etanol se dejó evaporar en baño seco a 50°C hasta que todo el etanol haya sido eliminado (7 min aprox.).

La extracción y purificación se realizó mediante el kit extracción PrepFiler™ BTA: la lisis se llevó a cabo con 220 μl de Buffer de lisis PrepFiler® BTA, 7 μl de proteinasa K [20mg/ml] y 3 μl de DTT [0.1M], a 70°C con 1100 rpm durante 45 min. Una vez realizada la lisis, se centrifugó la muestra por un minuto a 13,500 rpm. Se recuperaron 200 μl de lisado, los cuales fueron colocados en un tubo de microcentrifuga de 1.7 ml nuevo y estéril. El ADN se purificó en el equipo AutoMate Express™ (Applied Biosystems™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

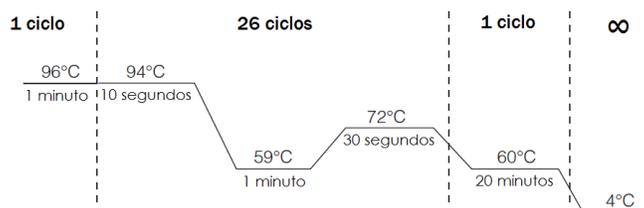
Cuantificación de ADN (PCR Tiempo Real)

La cuantificación del material genético se realizó mediante la técnica de PCR tiempo real utilizando el kit The Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems™). Para cada muestra se utilizaron 6.25 μl de Quantifiler® Duo PCR Reaction Mix, 5.25 μl de

Quantifiler® Duo Primer Mix y se cargó 1 µl de ADN. La curva de cuantificación consistió en 8 estándares de concentración conocida (50, 16.7, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21, 0.068 y 0.023 ng/ µl), la cual se realizó de la siguiente manera: Se enumeraron 8 tubos eppendorf de 500 µl del 1 al 8. Al primero de ellos se cargó con 30 µl de Quantifiler® Duo Dilution Buffer, mientras que a los 7 restantes se cargaron únicamente con 20 µl. Al tubo 1 se le agregaron 10 µl de Quantifiler® Duo DNA Standard se homogenizó perfectamente en vortex; ya homogenizado, se tomaron 10 µl del tubo 1 y se colocaron en el tubo 2, se homogenizó y se tomaron 10 µl del tubo 2 y se colocaron en el tubo 3 y así sucesivamente hasta completar los 8 tubos. De igual manera que las muestras se cargaron 6.25 µl de Quantifiler® Duo PCR Reaction Mix, 5.25 µl de Quantifiler® Duo Primer Mix y 1 µl de cada estándar. Las muestras fueron cargadas en una placa de 96 pozos en el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems™).

Amplificación de ADN (PCR Multiplex)

La amplificación del material genético se llevó a cabo mediante el kit de identificación humana PowerPlex® Fusion System (PROMEGA™). Para cada muestra se utilizó 1 µl de PowerPlex® Fusion 5X Master Mix, 1.2 µl de PowerPlex® Fusion 5X Primer Pair Mix, 2.5 µl de Agua y 1.0 µl de ADN [1ng/µl]. Se utilizó el termociclador Maxygen™ (Axygen™ Scientific) y las condiciones de termociclado fueron las siguientes:



Electroforesis capilar

Los productos amplificados fueron corridos mediante electroforesis capilar en el equipo 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™). Cada muestra se cargó con 12 µl de formamida, 0.3 µl de CC5 Internal Lane Standard 500 (PROMEGA™) y 0.6 µl de ADN amplificado. El ladder utilizado fue PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix y se cargó 1 µl acompañado de 12 µl de formamida. La obtención de los electroferogramas se realizó con el software GeneMapper ID-X (Applied Biosystems™).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software R (versión 3.3.0), para conocer la distribución de los datos se realizó el test de Shapiro–Wilk y para conocer la homocedasticidad de los datos se realizó la prueba de Levene. Una vez conocidos ambos supuestos se procedió a utilizar la prueba de Kruskal-Wallis para comprobar si había diferencias significativas en los tratamientos de fijación utilizados y la prueba *post hoc* Siegel-Tukey para conocer específicamente en cuáles de ellos se presentan esas diferencias.

RESULTADOS

Estandarización

Tiempo óptimo de fijación del tejido.

Con la finalidad de determinar el tiempo óptimo de fijación se realizó un experimento de estandarización con 6 horas, 24 horas, 48 horas, 5 días, 10 días y 15 días en ambos tratamientos de fijación con el músculo tomado del cadáver 1. Para determinar el grado de fijación se tomaron en cuenta tres características: coloración y dureza del tejido, así como la conservación histológica del tejido. En la Figura 14 Se muestra el cambio de coloración del tejido a las 6 y a las 24 horas. En la Figura 15 se muestran las preparaciones pertenecientes al tejido muscular fijado durante 6 y 24 horas en ambos tratamientos.

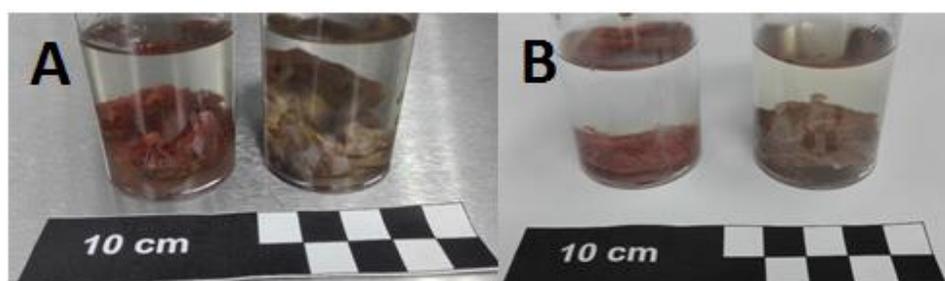


Figura 14. Fijación de los tejidos de acuerdo a su coloración. Se muestra la comparación en la fijación de tejido muscular a distintas horas: **A** Fijación a las 6 horas: T2 PEG (izq) y T1 Formol (der). **B** Fijación a las 24 horas: T2 PEG (izq) y T1 Formol (der).

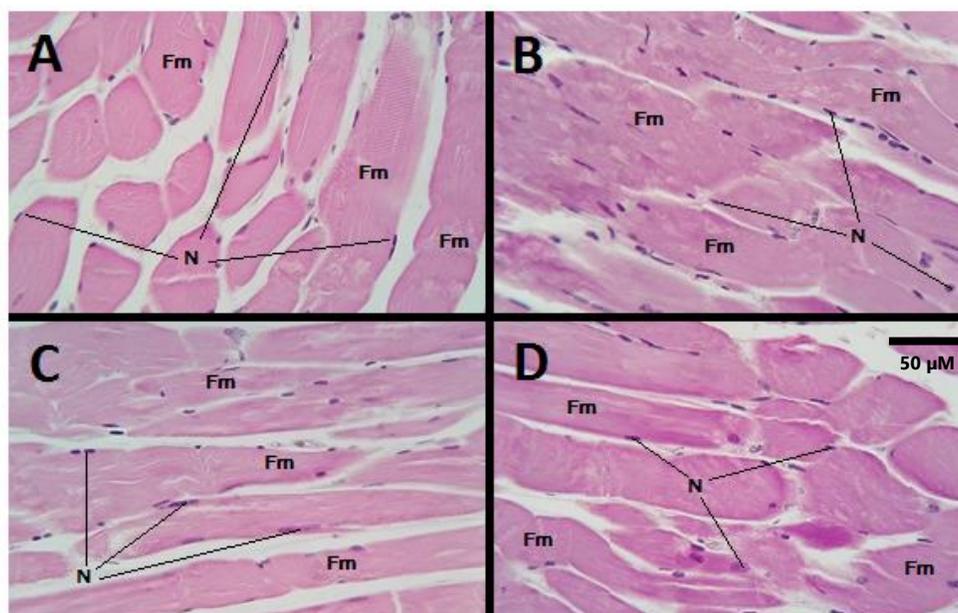


Figura 15. Fijación del tejido de acuerdo a su conservación histológica. Se muestran los cortes histológicos de tejido muscular fijados a distintos tiempos y tratamientos. **A** Fijación a las 6 horas T1, **B** Fijación a las 6 horas T2, **C** Fijación a las 24 horas T1 y **D** Fijación a las 24 horas T2. En todas las preparaciones se observan fibras musculares en corte transversal (**Fm**) y núcleos celulares (**N**) (40x).

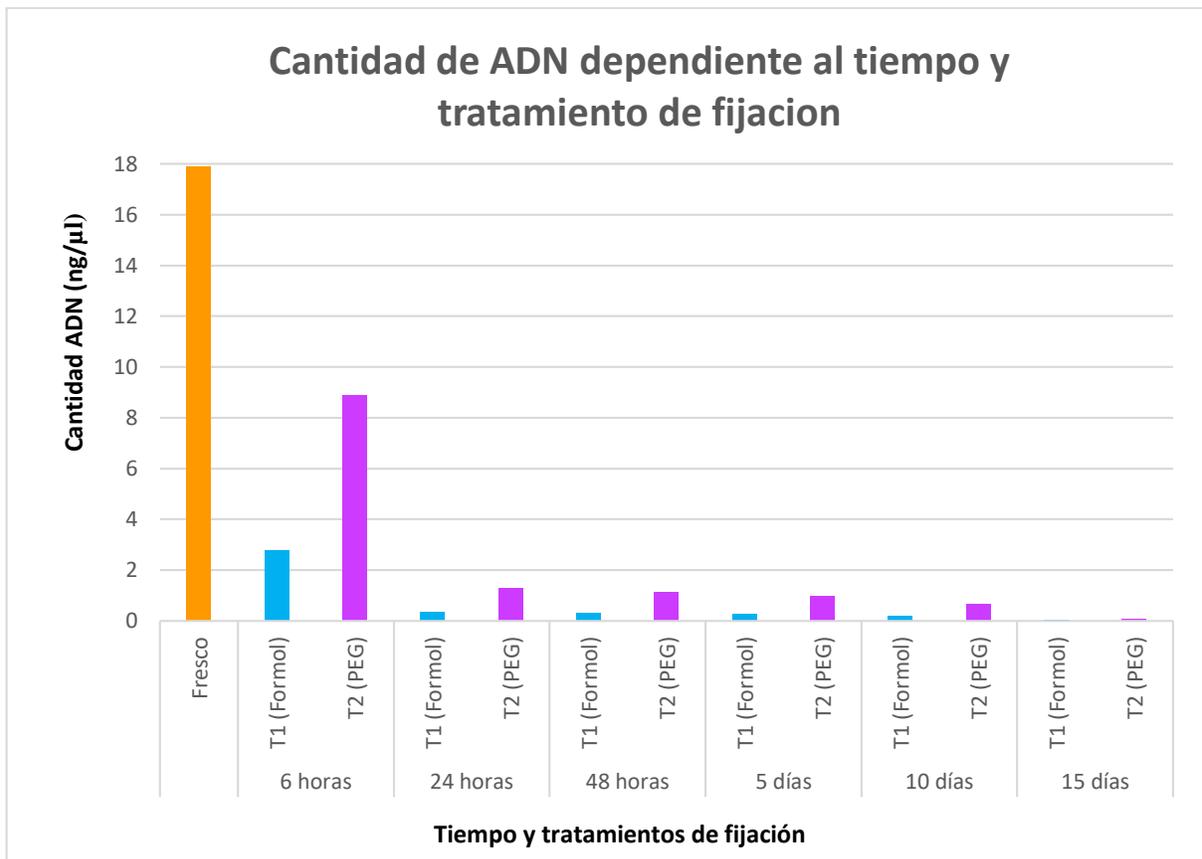
Únicamente se muestran los resultados de los dos primeros tiempos (6 y 24 horas) debido a que a partir de las 24 horas no se observaron cambios en los tejidos tanto en coloración como en la histología de los mismos.

Degradación del ADN durante la fijación

Además de encontrar el tiempo óptimo de fijación se buscó determinar en cuánto tiempo se degradaba el ADN imposibilitando la obtención de un perfil genético completo. Para ello se realizó la extracción de ADN a partir del tejido muscular fijado a los tiempos anteriormente mencionados. En la Tabla 1 se muestran los resultados de cuantificación y en la Gráfica 1 se muestra la comparación entre la cantidad de ADN obtenido en cada tiempo, así como en el tejido de referencia (tejido sin fijar) En las Fig. 16-18 se muestran los electroferogramas pertenecientes a la calidad del ADN a los tiempos de fijación de 24 horas, 5 y 15 días de fijación respectivamente.

Tabla 1. Cantidad de ADN dependiente al tiempo y tratamiento de fijación. Se muestra la cantidad de ADN (ng/ μ l) obtenido a partir de 50 mg de tejido muscular fresco (muestra de referencia) y 50 mg de tejido fijado en los T1 (formol) y T2 (PEG) a distintos tiempos, así como también se muestra el porcentaje de ADN recuperado en cada tiempo y tratamiento respecto al ADN recuperado en el tejido fresco que se consideró como el 100%.

Tiempo	Tratamiento	Cantidad ADN	ADN recuperado (%)
Muestra de referencia (Tejido fresco)		17.88	100.0
6 horas	T1 (Formol)	2.78	15.548
	T2 (PEG)	8.881	49.67
24 horas	T1 (Formol)	0.359	2.007
	T2 (PEG)	1.293	7.231
48 horas	T1 (Formol)	0.316	1.767
	T2 (PEG)	1.147	6.414
5 días	T1 (Formol)	0.293	1.638
	T2 (PEG)	0.989	5.531
10 días	T1 (Formol)	0.207	1.157
	T2 (PEG)	0.671	3.752
15 días	T1 (Formol)	0.052	0.29
	T2 (PEG)	0.075	0.419



Gráfica 1. Cantidad de ADN dependiente al tiempo y tratamiento de fijación. Se muestra una comparación entre la pérdida del ADN respecto al tiempo y tipo de fijador contra el ADN obtenido de tejido fresco. En el eje x se muestra el tiempo y tratamiento de fijación, mientras que en el eje y se muestra la cantidad (ng/μl) de ADN obtenido.

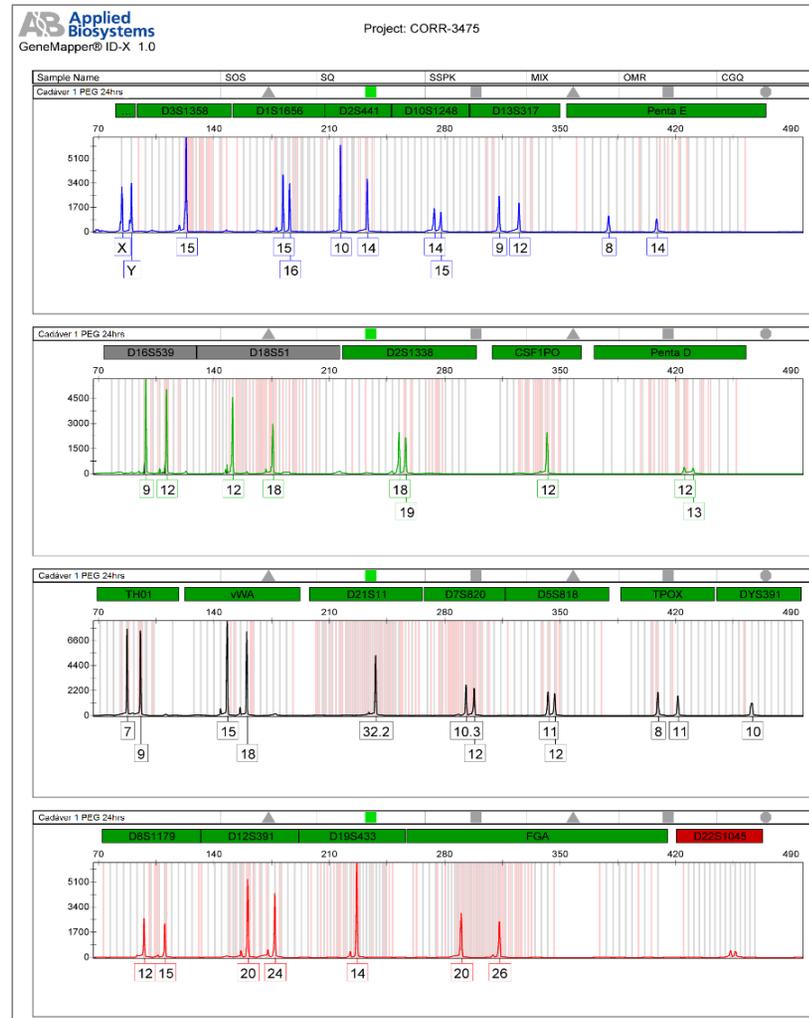
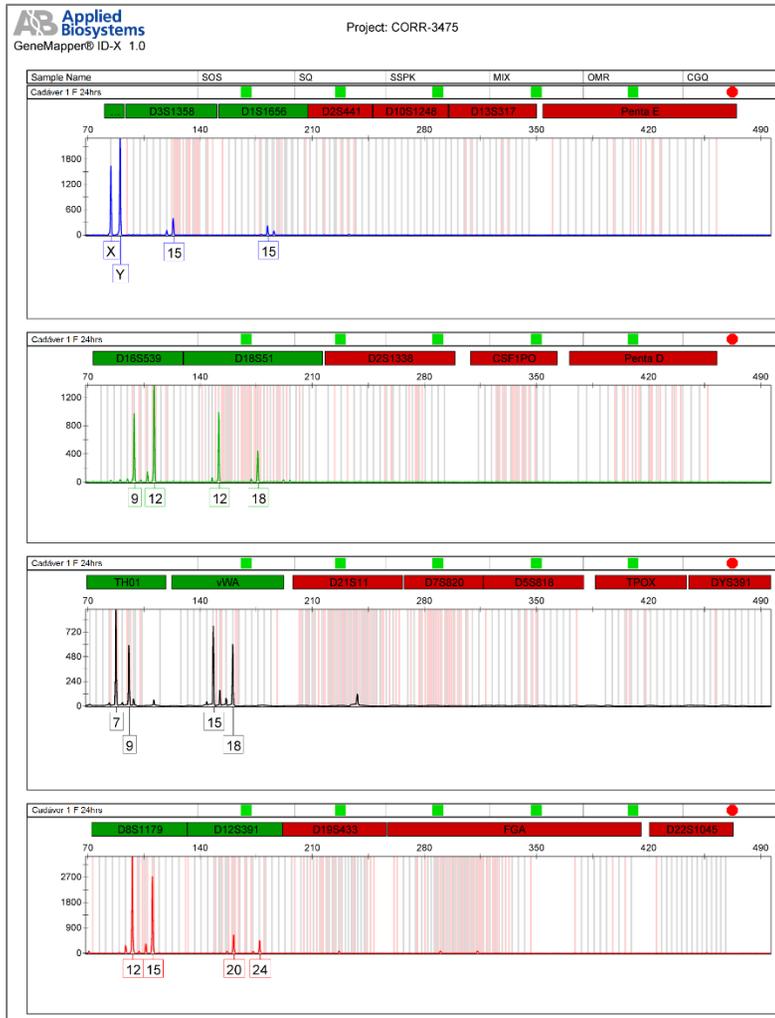


Figura 16. Calidad del ADN a las 24 horas de fijación. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido del cadáver 1 fijados en formol (izquierda) y en PEG (derecha) durante 24 horas. Se observa una gran degradación del ADN en la muestra fijada con formol teniendo una recuperación de sólo 8 marcadores de los 24 del kit PP-F (no se considera el marcador D1S1656 porque falta la detección de un alelo, ver perfil de referencia ANEXO II), mientras que en la muestra fijada con PEG a pesar de haber degradación del ADN hubo una recuperación de 23 marcadores.

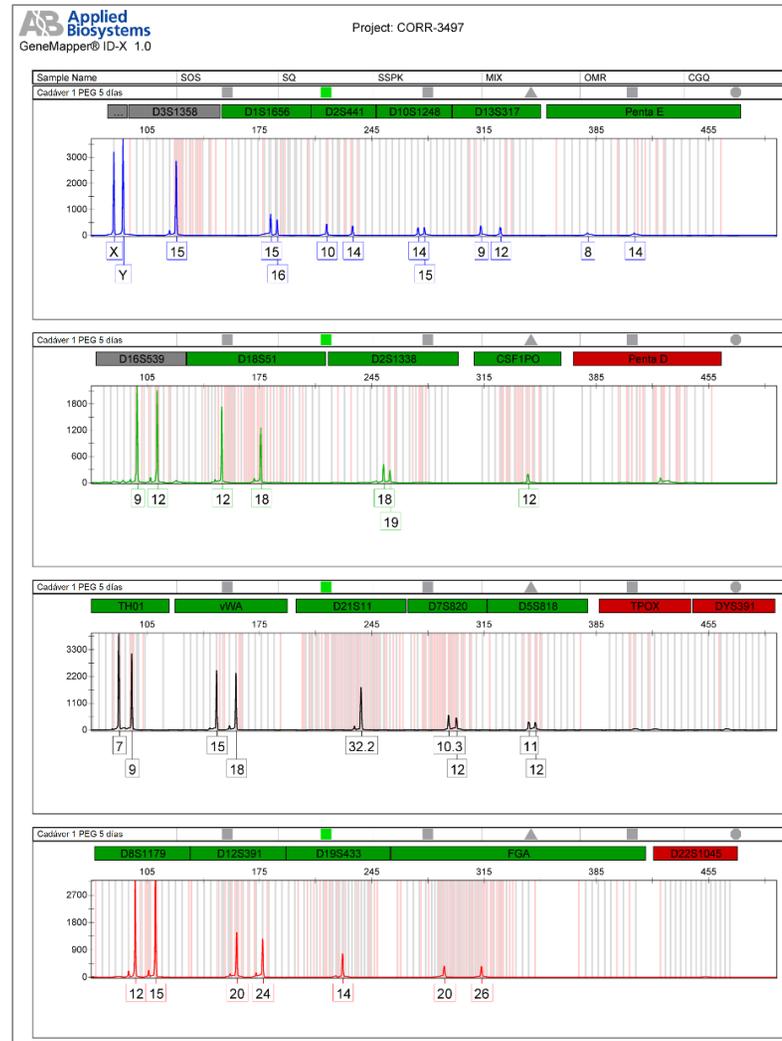
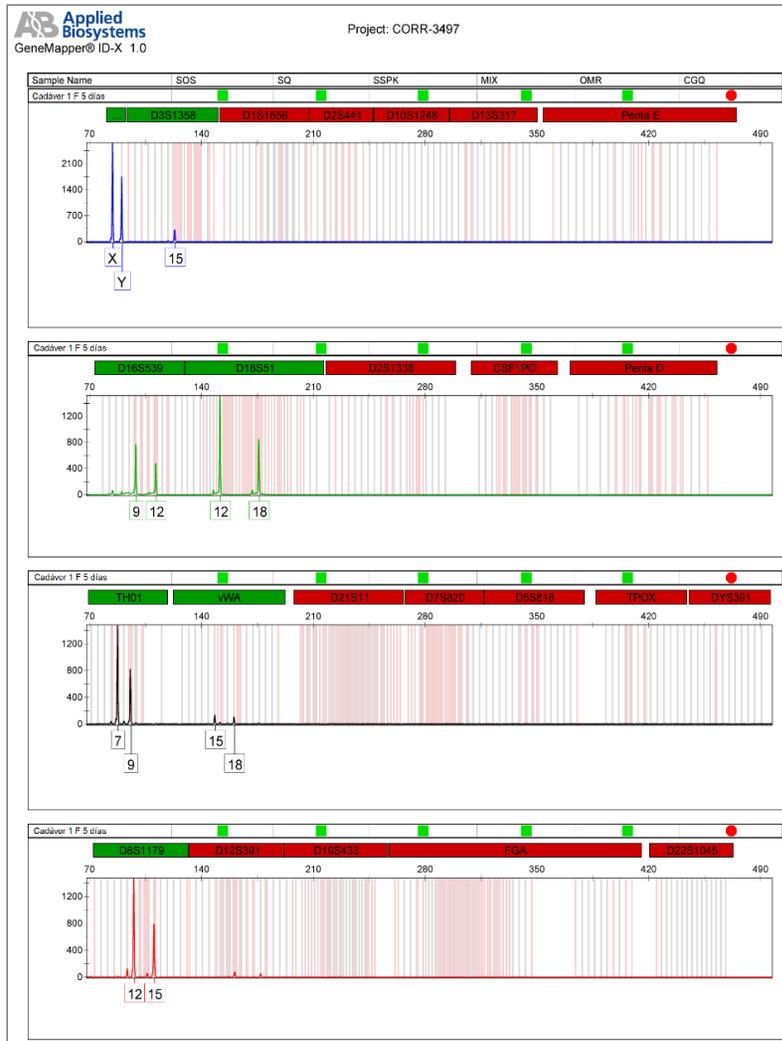


Figura 17. Calidad del ADN a los 5 días de fijación. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido del cadáver 1 fijados en formol (izquierda) y en PEG (derecha) durante 5 días. Se observa una gran degradación del ADN en la muestra fijada con formol teniendo una recuperación de sólo 7 marcadores de los 24 del kit PP-F, mientras que en la muestra fijada con PEG a presenta menor degradación permitiendo la recuperación de 20 de los 24 marcadores del kit PP-F.

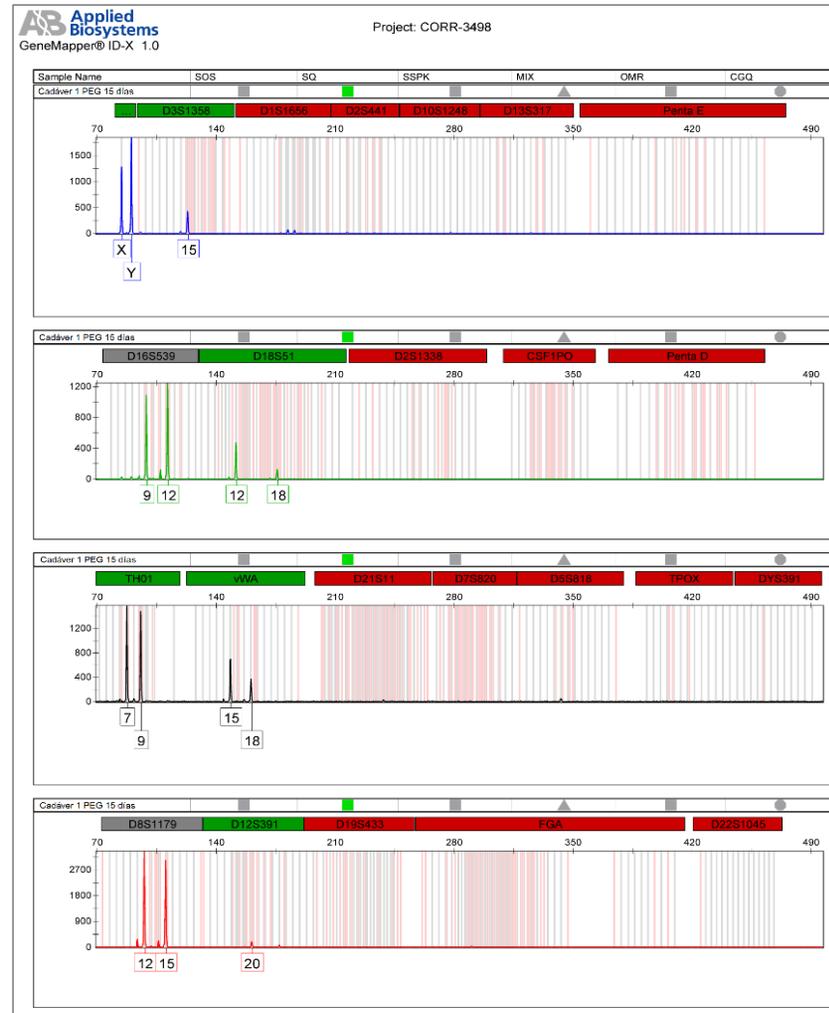
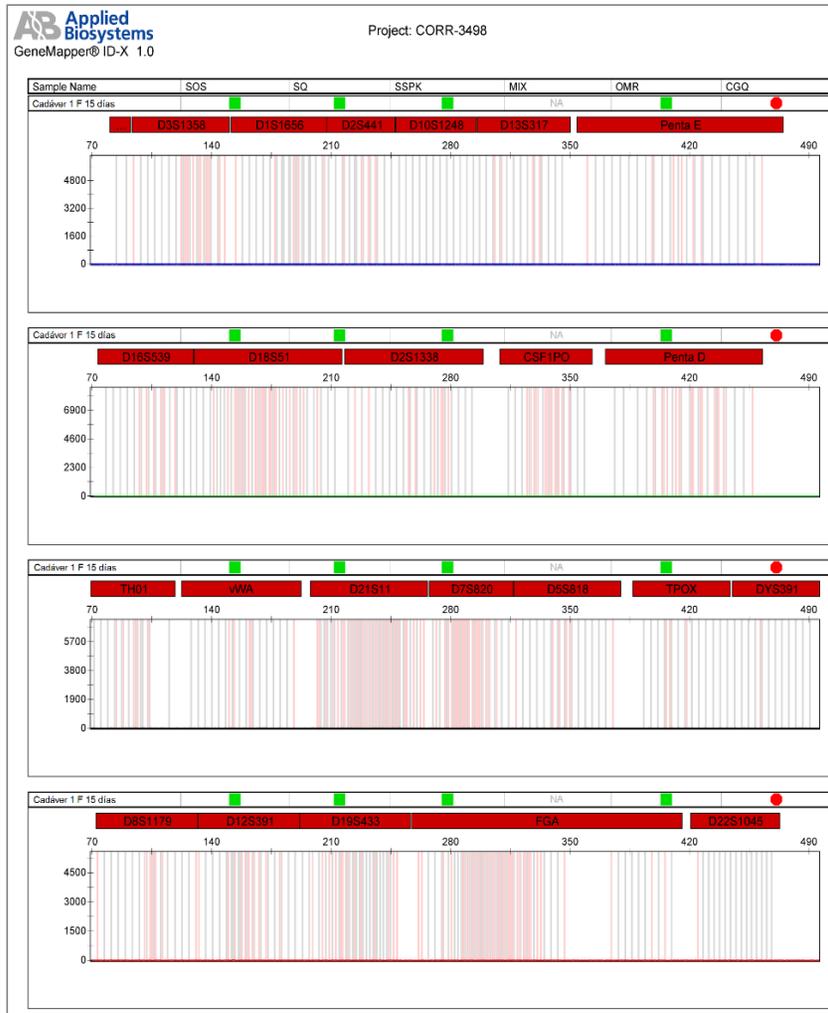


Figura 18. Calidad del ADN a los 15 días de fijación. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido del cádmver 1 fijados en formol (izquierda) y en PEG (derecha) durante 15 días. Se observa la degradación total del ADN en la muestra fijada con formol teniendo una nula detección de los marcadores del kit PP-F, mientras que en la muestra fijada con PEG la degradación es menor permitiendo una recuperación de 7 de los 24 marcadores del kit PP-F (no se considera el marcador D12S391 porque falta la detección de un alelo, ver perfil de referencia ANEXO II).

HISTOPATOLOGÍA

Conservación histológica

Se realizó la fijación de las muestras con PEG y los resultados se compararon contra el método tradicional de fijación que es el formol. Uno de los aspectos más importantes en la fijación del tejido es que se conserven todas las características histológicas propias del tejido en vida como lo son la forma y el arreglo celular, así como los detalles celulares e histológicos como la visualización del núcleo, nucléolos, estrías en tejido muscular esquelético, membranas basales, arterias, etc. En la Tabla 2 se muestra una valoración de la conservación histológica de los tejidos, la cual estuvo basada en que tan bien se conservaron las estructuras anteriormente mencionadas y en si se conservó o no el arreglo histológico de cada tejido. Se consideró un buen resultado la fijación que se obtiene con el formol utilizando ésta como referencia para calificar la fijación obtenida con el PEG.

Tabla 2. Conservación histológica de los tejidos. Se muestra una valoración de la conservación histológica de cada tejido de acuerdo al tipo de fijador que fue utilizado T1 (Formol) o T2 (PEG). ***Mala.** La fijación fue inferior a la esperada. ****Regular.** La fijación es casi la esperada. *****Buena.** La fijación es la esperada. ******Excelente.** La fijación es mejor a la esperada.

Tejido	Fijación T1 (Formol)	Fijación T2 (PEG)
Cardiaco	***	***
Nervioso	***	****
Hepático	***	***
Muscular	***	***
Pancreático	***	*
Pulmonar	***	***
Renal	***	***

Calidad de las tinciones histológicas

Debido a que el proceso de fijación no sólo interviene en la conservación histológica de las muestras, sino que también interviene en la afinidad de los colorantes de las tinciones histológicas; se realizaron 5 de las tinciones utilizadas regularmente en el área de patología forense: HE, PAS, ZN, Masson y Gram, con el fin de comprobar si el tratamiento de fijación intervenía o no en la calidad de tinción de cada una de ellas. En las Figuras 19-23 y se muestra la comparación de cada una de las tinciones realizadas en cada tratamiento de fijación. En el ANEXO I se muestran más microfotografías de cada una de las tinciones utilizadas.

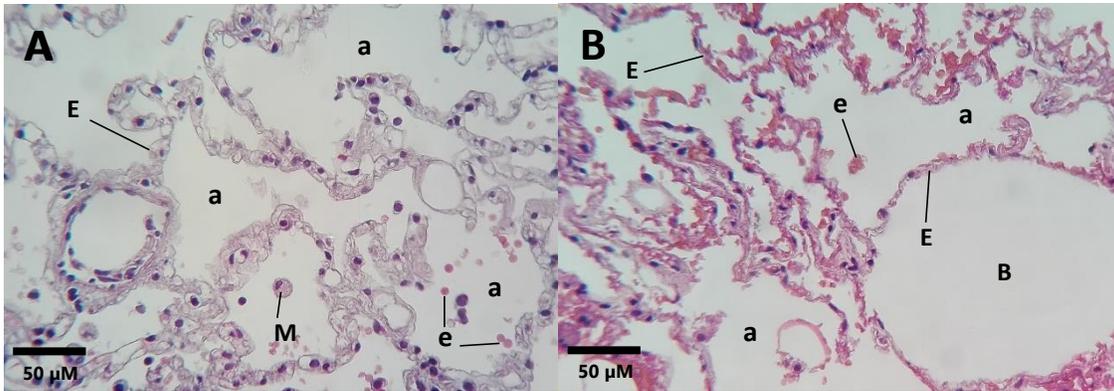


Figura 19. Tinción Hematoxilina-Eosina (HE). Comparación de la tinción HE en pulmón en ambos tratamientos fijadores: **A** T1 (Formol) y **B** T2 (PEG). Cortes de pulmón en donde se aprecia: alveolo pulmonar (**a**), bronquiolo (**B**), epitelio alveolar (**E**). Debido a que el pulmón presentaba edema se aprecian macrófagos (**M**) y eritrocitos (**e**) en los alveolos (**40x**).

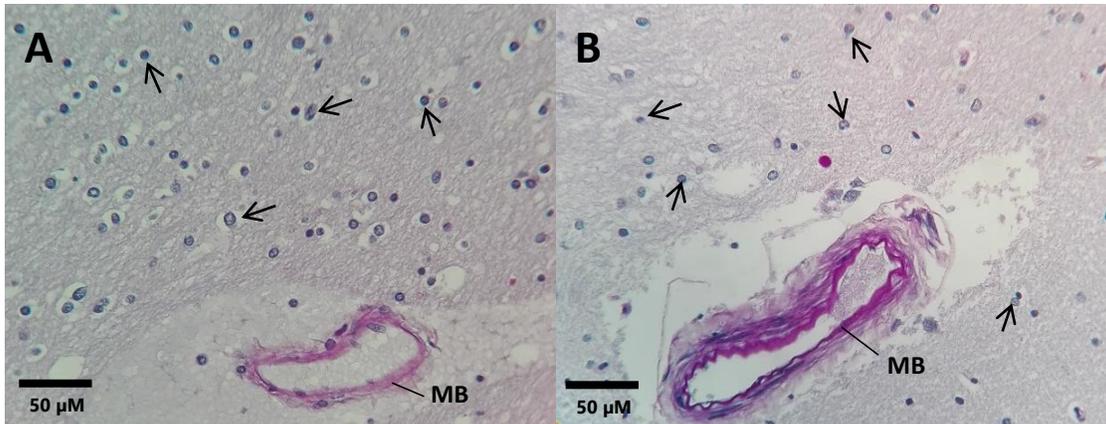


Figura 20. Tinción de Schiff (PAS). Comparación de la tinción PAS en encéfalo en ambos tratamientos fijadores: **A** T1 (Formol) y **B** T2 (PEG). Cortes de sustancia blanca en donde se aprecian los núcleos de los oligodendrocitos (flechas) teñidos en morado y arteriolas con la membrana basal teñida de purpura (**MB**) (**40x**).

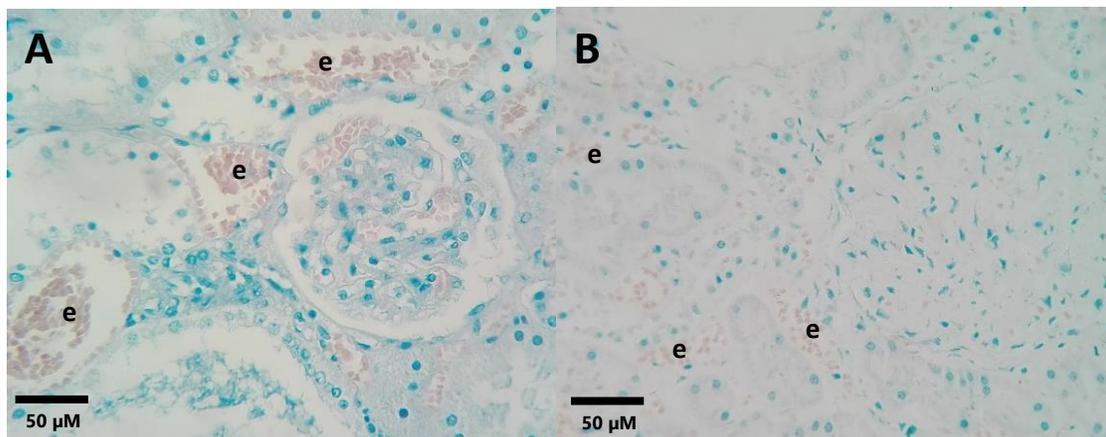


Figura 21. Tinción Ziehl-Nelsen (ZN). Comparación de la tinción ZN en riñón en ambos tratamientos fijadores: **A** T1 (Formol) y **B** T2 (PEG). Cortes de riñón en donde se aprecian los nucleos celulares, así como de las células que conforman los túbulos contorneados proximales y distales teñidos en azul y los eritrocitos (**e**) que se encuentran en los capilares en rojo. Tinción negativa para las BAAR y el bacilo de la tuberculosis (**40x**).

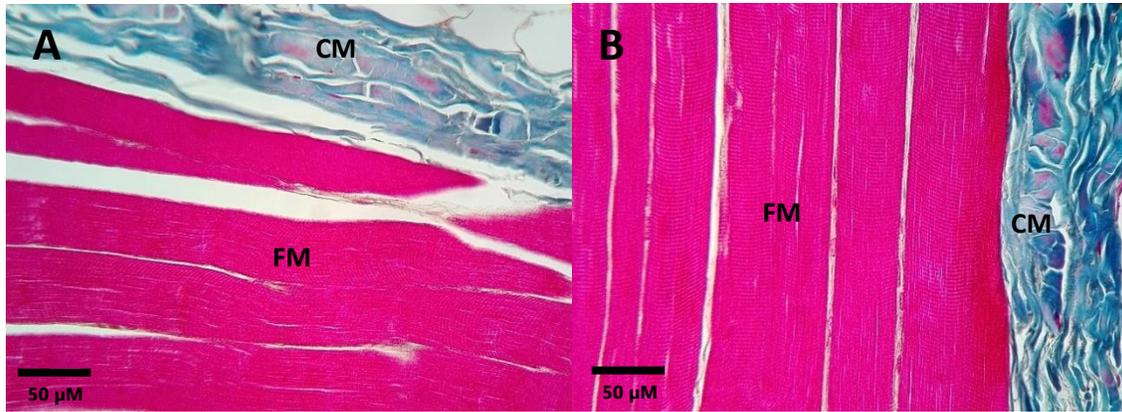


Figura 22. Tricrómica de Masson. Comparación de la tinción de Masson en músculo esquelético en ambos tratamientos fijadores: **A** Tratamiento 1 (Formol) y **B** Tratamiento 2 (PEG). Cortes de músculo estriado en donde se muestran las fibras musculares (FM) en corte transversal teñidas en rosa y en azul la colagena madura (CM) (40x).

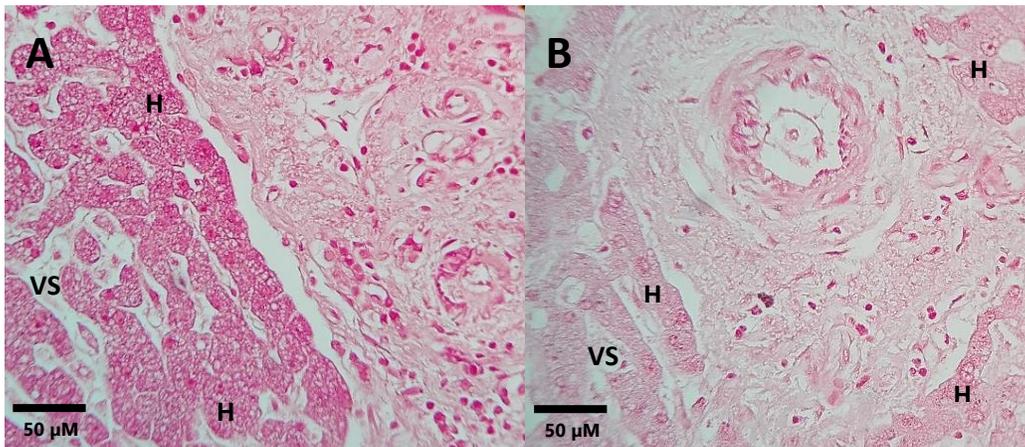


Figura 23. Tinción Gram. Comparación de la tinción Gram en hígado en ambos tratamientos fijadores: **A** T1 (Formol) y **B** T2 (PEG). Corte de hígado dónde se aprecian los hepatocitos (H) formando cordones, vasos sinusoides (VS) intercalados entre los cordones hepáticos, así como también se aprecian las áreas portales. Se tiñen de rojo todas las estructuras celulares (nucleo y citoplasma) con mayor o menor intensidad. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).

De acuerdo a lo observado, se realizó una valoración en la coloración, el contraste, el detalle de las estructuras celulares y las características propias de cada tinción, para ver si las diferencias que se pudiesen presentar en la fijación con PEG dificultan o imposibilitan la identificación de estructuras o posibles patologías al momento de realizar los análisis correspondientes. Se consideró un buen resultado la fijación que se obtiene con el formol utilizando ésta como referencia para calificar la fijación obtenida con el PEG. La valoración de cada criterio se describe a continuación:

Coloración. Se comparó la intensidad con la que cada uno de los colorantes tiñó el tejido, si ésta era mayor o menor respecto a la esperada.

Contraste. Se busca que los colores de los diferentes colorantes de una tinción (Ej. Hematoxilina y Eosina), se diferencien entre sí y permitan observar las estructuras teñidas de manera clara.

Detalle de las estructuras celulares e histológicas. Dependiendo del tipo del tejido del que se trate se busca que los detalles de la célula se logren apreciar con claridad; ejemplo de ello son los núcleos, nucléolos, citoplasma bien delimitado, epitelios, membranas basales, tejido conjuntivo, etc.

Tinciones particulares. Algunas tinciones además de identificar las estructuras celulares, tienen como objetivo la diferenciación de estructuras celulares específicas e incluso algunas bacterias, ejemplo de ello son las membranas basales, colágeno maduro, bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), bacterias ácido-alcohol resistentes, bacterias gram positivas o gram negativas. En este tipo de tinciones se valoró que la estructura o la bacteria se tiñeran y fuera posible su identificación gracias a la misma.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la valoración de la calidad de cada tinción y en cada tejido respecto a los tratamientos de fijación.

Tabla 3. Tinciones histológicas. Se muestra una valoración de las características esperadas en cada una de las tinciones utilizadas (HE, PAS, ZN, Masson y Gram) y se hace la comparación entre los tratamientos fijadores 1 y 2. ***Malo.** Los resultados son inferiores a los esperados. ****Regular.** Los resultados son casi los esperados. *****Bueno.** Los resultados son los adecuados y/o esperados con formol. ******Excelente.** Los resultados son mejores a los esperados a las metodologías tradicionales. **NV No valorable.** Características que no se pudieron determinar debido a que las muestras eran negativas para la característica solicitada.

Tinción	Característica	Corazón		Encéfalo		Hígado		Músculo		Páncreas		Pulmón		Riñón	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
H-E	Coloración	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Contraste	***	***	***	**	***	**	***	***	***	*	***	**	***	***
	Detalle estructuras celulares	***	***	***	**	***	**	***	***	***	*	***	**	***	***
PAS	Coloración	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
	Contraste	***	***	***	****	***	***	***	***	***	*	***	***	***	****
	Detalle estructuras celulares	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***
	Tinción de membranas basales	***	***	***	****	***	***	***	****	***	*	***	***	***	***
ZN	Coloración	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	*
	Contraste	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	***	***	**
	Detalle estructuras celulares	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	Tinción bacilo tuberculosis	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	Tinción BAAR	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Masson	Coloración	***	***	***	***	***	***	***	****	***	***	***	***	***	***
	Contraste	***	***	***	***	***	****	***	****	***	***	***	***	***	****
	Detalle estructuras celulares	***	***	***	***	***	***	***	****	***	*	***	***	***	***
	Tinción colágeno maduro	***	****	***	****	***	****	***	****	***	****	***	****	***	****
	Tinción membranas basales	***	***	***	***	***	***	***	****	***	***	***	***	***	***
Gram	Coloración	***	***	***	**	***	**	***	**	***	**	***	**	***	**
	Contraste	***	***	***	***	***	**	***	***	***	**	***	**	***	***
	Detalle estructuras celulares	**	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**
	Tinción de bacterias G+ y G-	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
		Corazón		Encéfalo		Hígado		Músculo		Páncreas		Pulmón		Riñón	

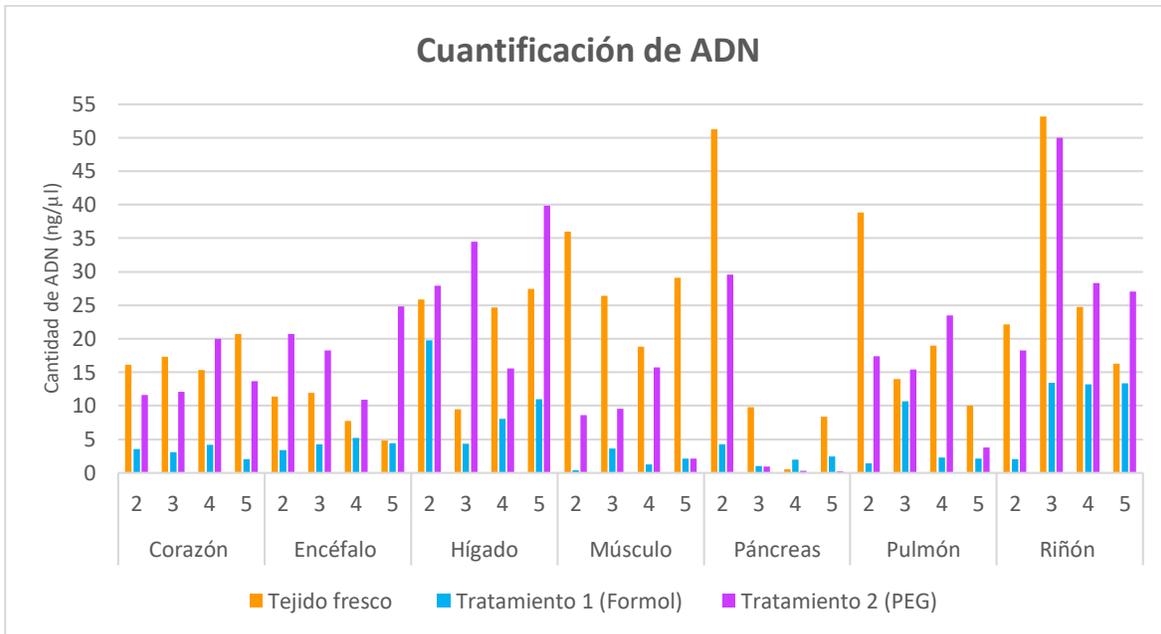
GENÉTICA

Cuantificación de ADN (Cantidad de ADN)

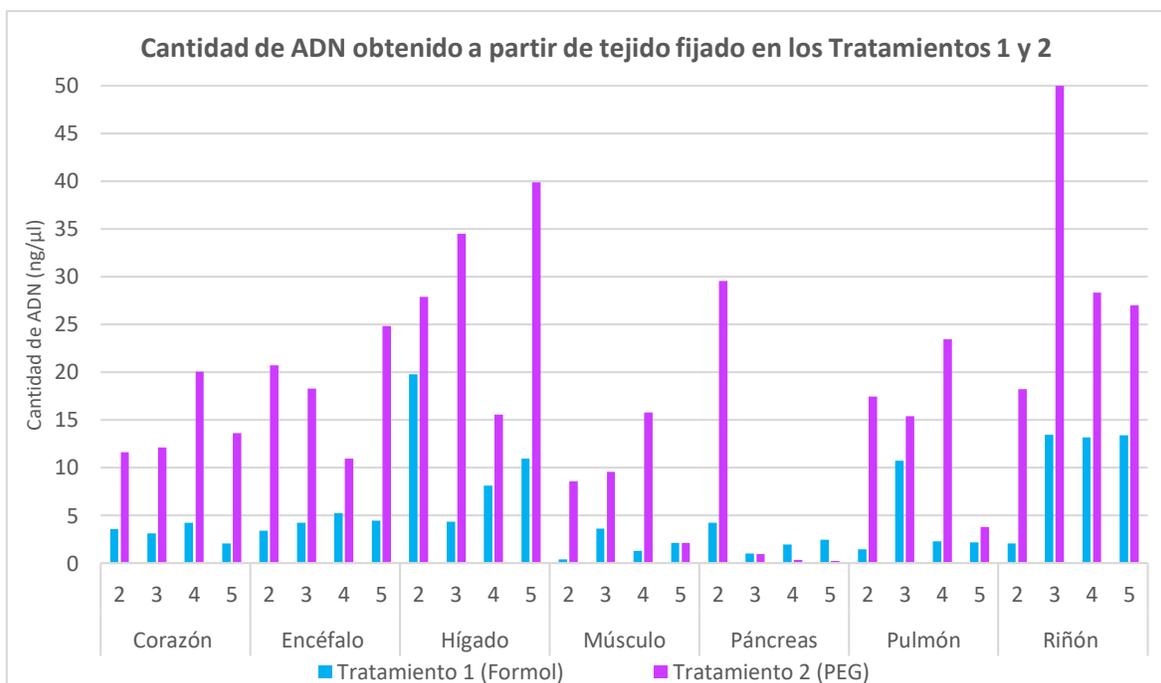
Se realizó la extracción, purificación y cuantificación del ADN de tres tipos de muestras: tejido en fresco, (muestra de referencia), tejido incluido en bloque de parafina fijado con el T1 (Formol) y tejido incluido en bloque de parafina fijado con el T2 (PEG). Los resultados de la cuantificación del ADN se muestran en la Tabla 4. Mientras que en la Gráfica 1 se muestra la comparación de la cantidad de ADN obtenido a partir de los tres tipos de muestras trabajadas y en la Gráfica 2 se observa la comparación del ADN obtenido a partir de los tejidos fijados en los T1 y T2 incluidos en bloques de parafina.

Tabla 4. Cuantificación de ADN. *Se muestran las cantidades de ADN obtenido (ng/ μ l) de los siete tejidos trabajados de cada uno de los cadáveres. BP-T1: Bloque de parafina Tratamiento 1, BP-T2: Bloque de parafina Tratamiento 2.*

Cadáver	Tejido	Tejido fresco	BP-T1 (Formol)	BP-T2(PEG)
2	Cardiaco	16.096	3.583	11.625
	Nervioso	11.416	3.384	20.719
	Hepático	25.901	19.759	27.904
	Muscular	35.976	0.410	8.576
	Pancreático	51.235	4.240	29.556
	Pulmonar	38.836	1.436	17.418
	Renal	22.168	2.081	18.244
3	Cardiaco	17.278	3.096	12.130
	Nervioso	11.922	4.239	18.251
	Hepático	9.519	4.318	34.514
	Muscular	26.451	3.643	9.538
	Pancreático	9.797	1.019	0.966
	Pulmonar	13.966	10.708	15.382
	Renal	53.163	13.473	49.983
4	Cardiaco	15.362	4.222	20.029
	Nervioso	7.769	5.230	10.937
	Hepático	24.698	8.094	15.544
	Muscular	18.825	1.276	15.758
	Pancreático	0.508	1.960	0.331
	Pulmonar	18.998	2.300	23.452
	Renal	24.719	13.177	28.315
5	Cardiaco	20.730	2.040	13.639
	Nervioso	4.782	4.454	24.842
	Hepático	27.471	10.966	39.857
	Muscular	29.128	2.092	2.143
	Pancreático	8.341	2.434	0.227
	Pulmonar	10.014	2.153	3.779
	Renal	16.295	13.391	27.024



Gráfica 2. Cuantificación de ADN. Se muestran una comparación de las cantidades de ADN obtenidos a partir de los tres tipos de muestra: Tejido fresco, tejido incluido en bloque de parafina fijado en el tratamiento 1 (BP-T1) y tejido incluido en bloque de parafina fijado en el tratamiento 2 (BP-T2). En el eje (x) se muestran los resultados por órgano y los números indican el cadáver al que pertenece la muestra, en el eje (y) se muestra la cantidad de ADN obtenido en ng/μl.

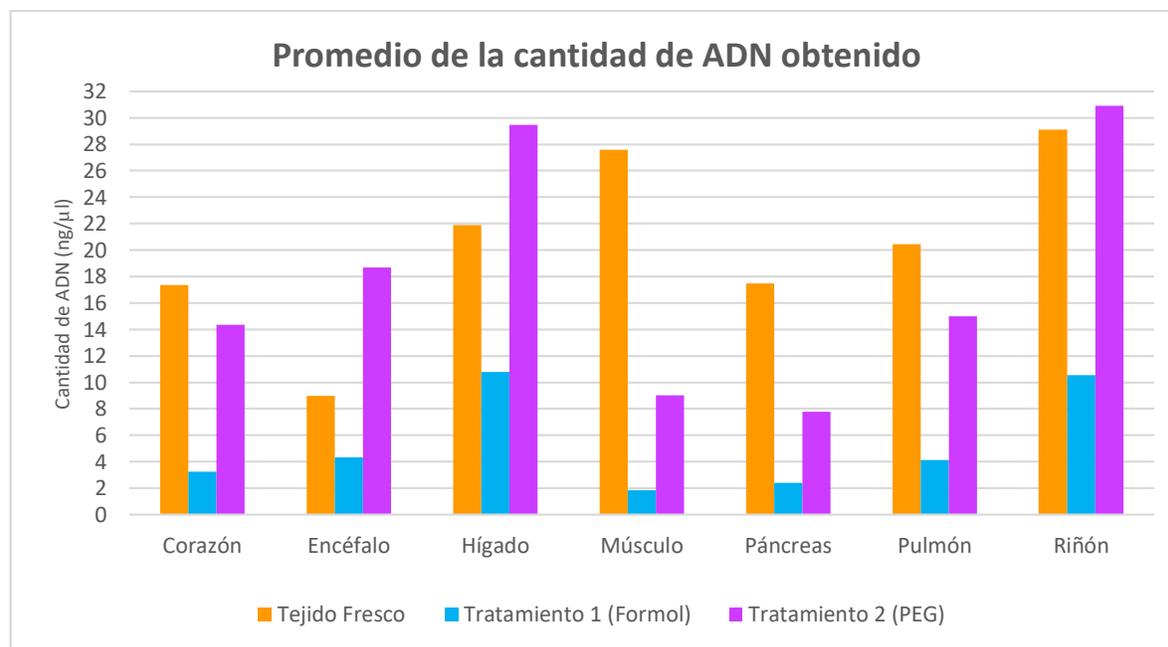


Gráfica 3. Cantidad de ADN obtenido a partir de tejido fijado en los Tratamientos 1 y 2. Se muestra la comparación de la cantidad de ADN obtenido de las extracciones a partir de bloques de parafina de los Tratamientos 1 (formol) BP-T1 y Tratamiento 2 (PEG) BP-T2. En el eje (x) se muestran los resultados por órgano y los números indican el cadáver al que pertenece la muestra, en el eje (y) se muestra la cantidad de ADN obtenido en ng/μl.

Posteriormente se calculó el promedio de los valores de cuantificación obtenidos por órgano, con el fin de determinar en cuál de ellos se obtenía una mayor cantidad de ADN, tanto en la muestra de referencia como en los tratamientos fijadores, los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Gráfica 3.

Tabla 5. Promedio de cuantificación de ADN por órgano. Se muestran los promedios de las cantidades (ng/ μ l) de ADN para cada órgano en la muestra de referencia (tejido fresco) y los tratamientos de fijación **BP-T1**: Bloque de parafina Tratamiento 1, **BP-T2**: Bloque de parafina Tratamiento 2.

Órgano	Tejido Fresco	BP-T1 (Formol)	BP-T2 (PEG)
Cardiaco	17.366	3.235	14.355
Nervioso	8.972	4.326	18.687
Hepático	21.897	10.784	29.454
Muscular	27.595	1.855	9.003
Pancreático	17.470	2.413	7.770
Pulmonar	20.453	4.149	15.007
Renal	29.086	10.530	30.891



Gráfica 4. Promedio de la cantidad de ADN obtenido. Se muestra la comparación de los promedios de cuantificación de cada órgano en los tres tipos de muestra: Tejido fresco, tejido incluido en bloque de parafina fijado en el tratamiento 1 (BP-T1) y tejido incluido en bloque de parafina fijado en el tratamiento 2 (BP-T2). En el eje (x) se muestran los órganos mientras que en el eje (y) se muestra la cantidad de ADN obtenido en ng/ μ l.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico a los datos anteriormente presentados, se consideraron tres grupos uno de referencia (tejido fresco) y dos grupos problema (fijación con T1 y T2). Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov con la corrección del test de Shapiro–Wilk, obteniendo una $p=0.03905$ para el tejido fresco, $p=8.864 \times 10^{-5}$ para el T1 y $p=0.3494$ para el T2. Considerando un $\alpha=0.05$, se rechazó el supuesto de que los datos de los grupos de tejido fresco y T1 tienen una distribución normal, siendo el T2 el único grupo que cumple con una distribución normal. En la Figura 24 se muestran las gráficas cuantil-cuantil (Q-Q) de cada uno de los grupos anteriormente mencionados.

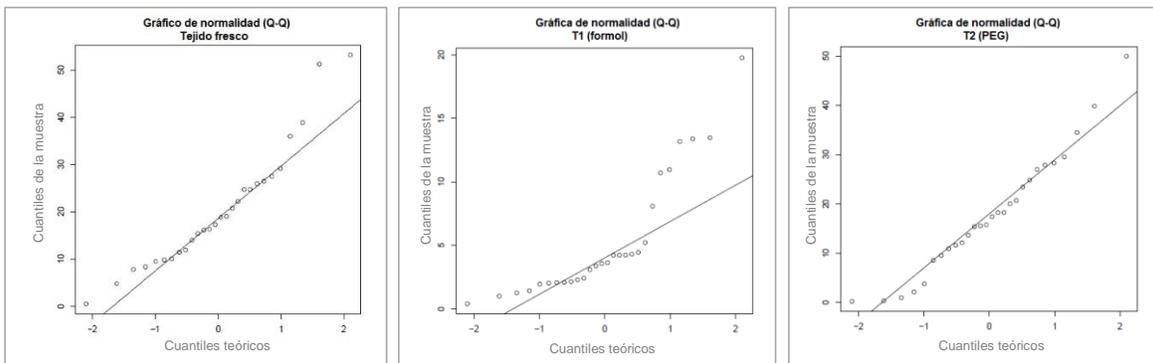


Figura 24. Gráficas cuantil-cuantil (Q-Q) de normalidad. Se muestran las gráficas de normalidad para los grupos: Tejido fresco (izquierda), T1 (formol) (centro) y T2 (PEG) (derecha).

Por su parte, para verificar la homocedasticidad en los tres grupos se realizó la prueba de Levene, obteniendo un valor de $p=0.00159$, que al ser menor al nivel de significancia $\alpha=0.05$, se rechazó el supuesto de homogeneidad en las varianzas.

Debido a que los supuestos de normalidad y homocedasticidad no se cumplen en los tres grupos analizados, los datos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis como una alternativa no paramétrica al modelo ANOVA de una vía para comparar más de dos grupos independientes.

Siendo: **H₀**: Las medianas de los tres tipos de muestra son iguales

H_a: De las 3 medianas, al menos una es distinta

Y considerando un $\alpha=0.05$, 2 grados de libertad y una $\chi^2=28.2803$. Se tiene que el valor obtenido es $p=7.228 \times 10^{-7}$, que al ser menor al nivel de significancia α , se rechaza la **H₀**, lo que supone que en al menos en dos grupos existen diferencias en la mediana. Para conocer

cuáles es el grupo o los grupos que presentan diferencias se realizó un análisis *post-hoc* Siegel-Tukey.

Siendo: **H₀**: Existen diferencias entre los grupos comparados

H_a: No existen diferencias en los grupos comparados

Y considerando un $\alpha=0.05$, los valores obtenidos de la prueba son los siguientes:

Grupos comparados	Dif. observada	Dif. crítica	Diferencia
Tejido fresco - T1 (formol)	32.142857	15.60684	Verdadera
Tejido fresco - T2 (PEG)	4.821429	15.60684	Falsa
T1 (formol) – T2 (PEG)	27.321429	15.60684	Verdadera

Para la comparación entre los grupos Tejido fresco - T1 (formol) y T1 (formol) - T2 (PEG) se acepta la H₀, mientras que para la comparación entre el Tejido fresco y T2 (PEG) la H₀ se rechaza. Los datos anteriormente mostrados indican que no existen diferencias significativas entre las cantidades de ADN recuperadas de las muestras de referencia (tejido fresco) y las muestras fijadas con PEG (T2), contrario a lo que sucede con el T1 donde si existen diferencias significativas en la cantidad de ADN obtenido comparadas con las muestras de referencia.

Electroforesis capilar (Calidad del ADN)

Una vez obtenida la cantidad de ADN de cada muestra se procedió a realizar el corrimiento electroforético de las muestras con la finalidad de valorar la calidad del mismo, así como para obtener el perfil genético que permitiera llevar a cabo la identificación de la muestra mediante marcadores genéticos. De los 28 tejidos trabajados para cada tipo de muestra, se realizó un conteo de los perfiles genéticos completos (perfiles con detección de todos los marcadores) y parciales (perfiles con al menos un marcador no detectado) que se obtuvieron para cada tipo de muestra, en la Tabla 6 se muestra el número de perfiles parciales obtenidos en cada caso, así como también los marcadores que no fueron detectados. Posteriormente se realizó la suma de todos los marcadores no detectados del conjunto de los perfiles genéticos trabajados y esa suma fue considerada como la totalidad de los marcadores genéticos que se pierden, para posteriormente obtener el porcentaje individual de cada marcador genético no detectado.

En las Figuras 25-30 se presentan los electroferogramas que muestran la calidad de ADN (grado de degradación) de las muestras de acuerdo al tratamiento de fijación al que fueron sometidas (formol o PEG).

Tabla 6. Calidad del ADN (grado de degradación) de acuerdo los marcadores genéticos no detectados. En la sección 1 de la tabla se muestran los datos correspondientes a los perfiles genéticos parciales obtenidos en cada tipo de muestra trabajada. El número en cada marcador corresponde al número de perfiles genéticos en los que no fue detectado ese marcador. En la sección 2 la suma de marcadores representa el número de veces que no fue posible la detección de estos en todas las muestras analizadas. El porcentaje por marcador indica el valor expresado en porcentaje del total de marcadores que no fueron detectados.

Sección 1				Sección 2	
Muestra	Tejido Fresco	BP-T1	BP-T2	Suma de marcadores	Porcentaje por marcador (%)
Perfiles parciales	3/28	16/28	2/28		
Marcadores genéticos no detectados	D10S1248	1	--	1	3.12
	D13S317	1	--	--	1.56
	Penta E	3	2	2	10.93
	D2S1338	2	--	1	4.69
	CSF1PO	2	--	1	4.69
	Penta D	3	4	1	12.5
	D5S818	--	--	1	1.56
	TPOX	3	2	1	9.37
	DYS391	3	8	2	20.31
	D12S391	--	--	1	1.56
	FGA	--	--	1	1.56
	D22S1045	3	14	1	28.12
T O T A L				64	100

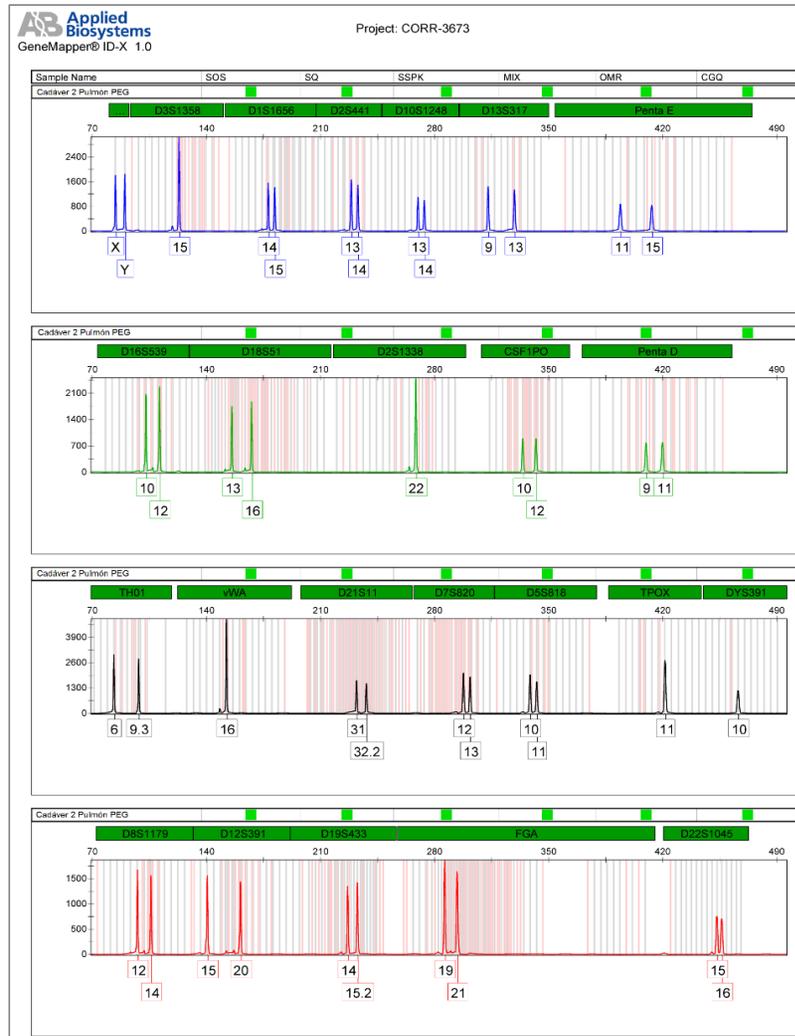
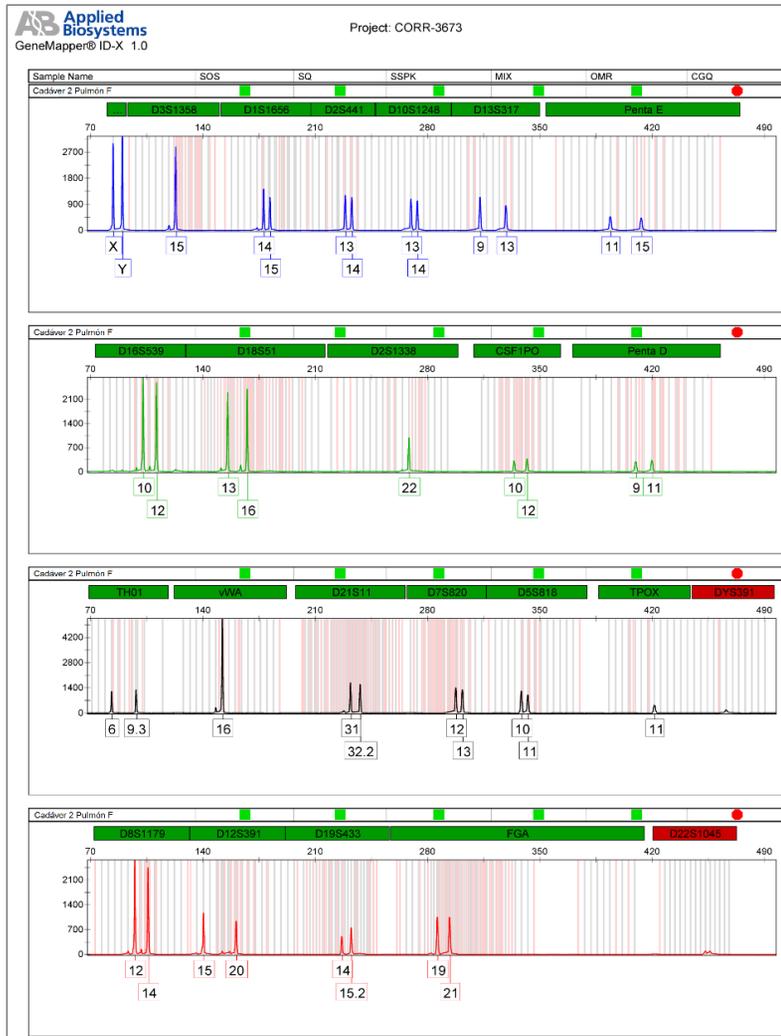


Figura 25. Calidad del ADN de tejidos incluidos en parafina. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido pulmonar del cadáver 2 fijado en formol (izquierda) y en PEG (derecha) e incluidos en bloques de parafina. Se observa que la fijación con formol degradó el ADN de alto peso molecular (>420 pb) imposibilitando la detección de 2 de los 24 marcadores del kit PP-F, mientras que la fijación con PEG no degradó el ADN permitiendo la detección de todos los marcadores del kit PP-F.

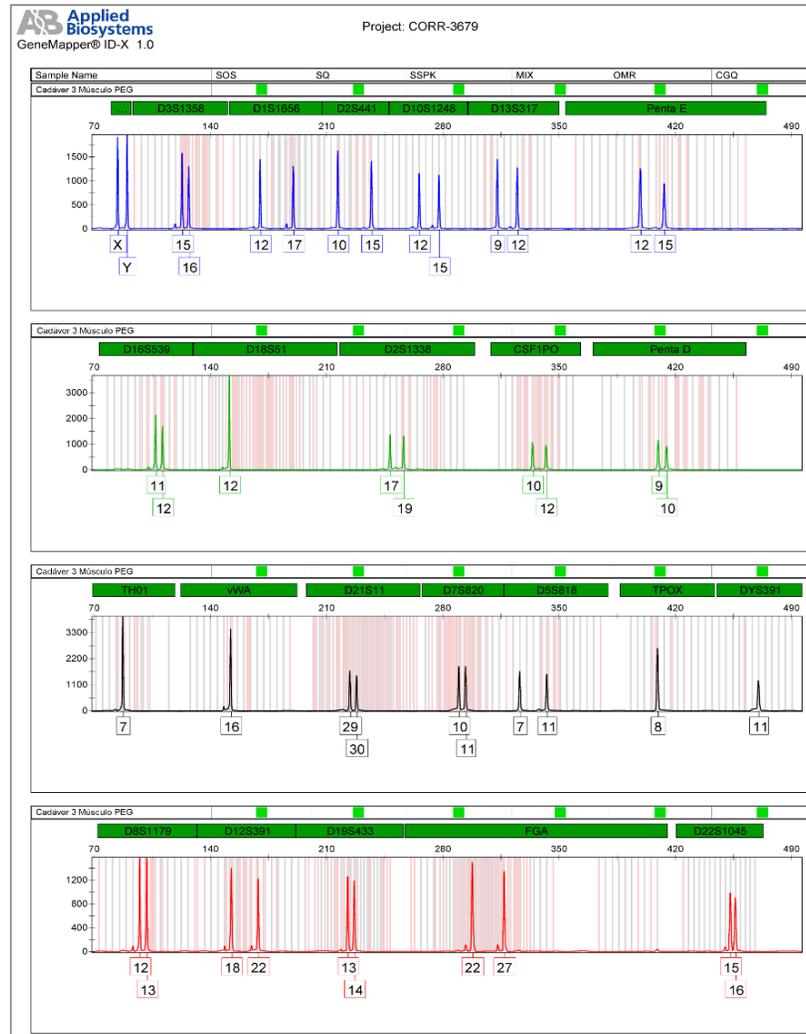
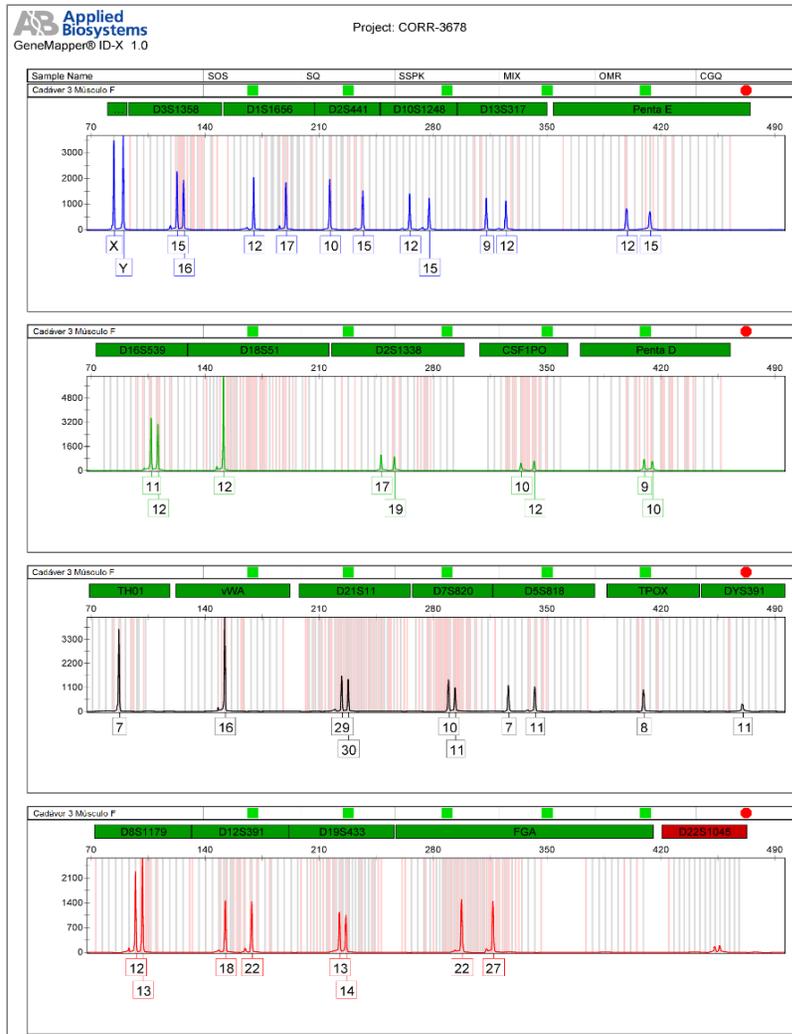


Figura 26. Calidad del ADN de tejidos incluidos en parafina. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido muscular del cadáver 3 fijado en formol (izquierda) y en PEG (derecha) e incluidos en bloques de parafina. Se observa que la fijación con formol degradó el ADN de alto peso molecular (>420 pb) imposibilitando la detección de 1 de los 24 marcadores del kit PP-F, mientras que la fijación con PEG no degradó el ADN permitiendo la detección de todos los marcadores del kit PP-F.

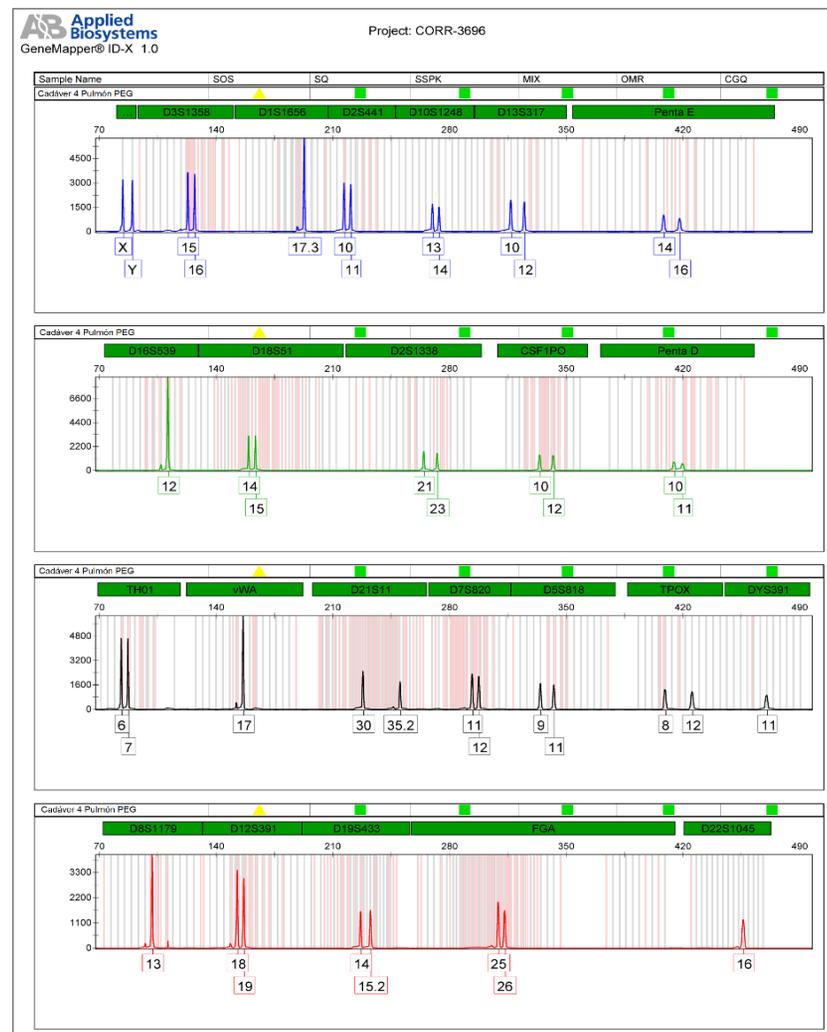
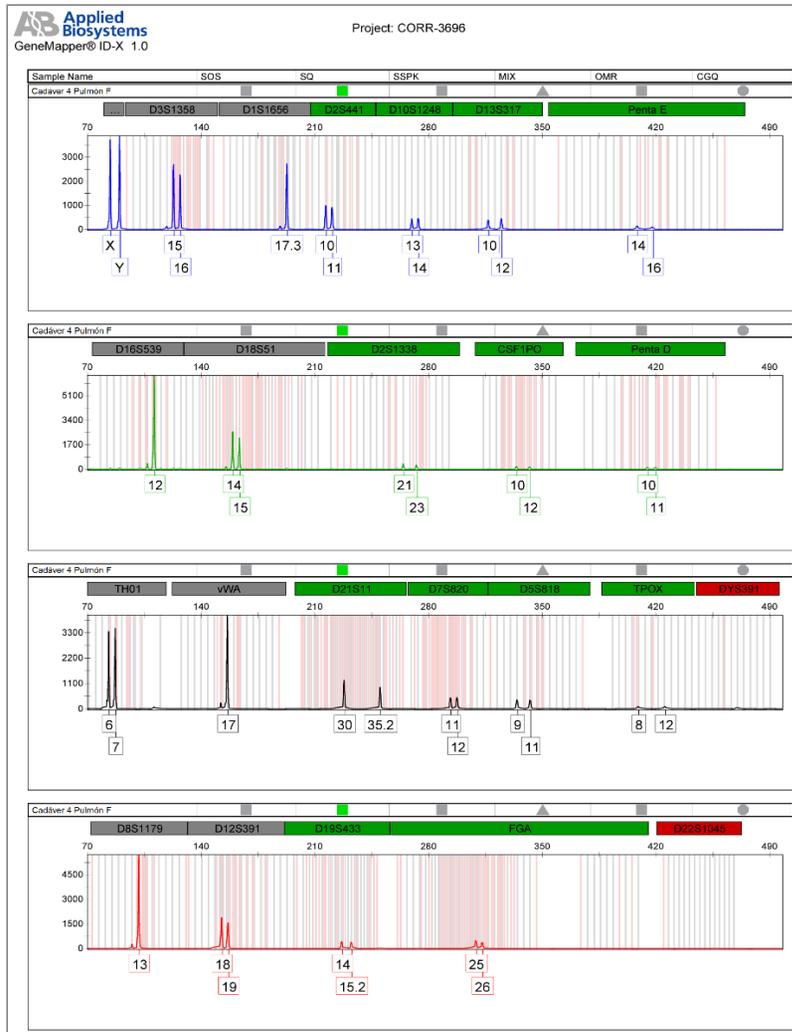


Figura 27. Calidad del ADN de tejidos incluidos en parafina. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido pulmonar del cadáver 4 fijado en formol (izquierda) y en PEG (derecha) e incluidos en bloques de parafina. Se observa que la fijación con formol degradó el ADN de alto peso molecular (>420 pb) imposibilitando la detección de 2 de los 24 marcadores del kit PP-F, mientras que la fijación con PEG no degradó el ADN permitiendo la detección de todos los marcadores del kit PP-F.

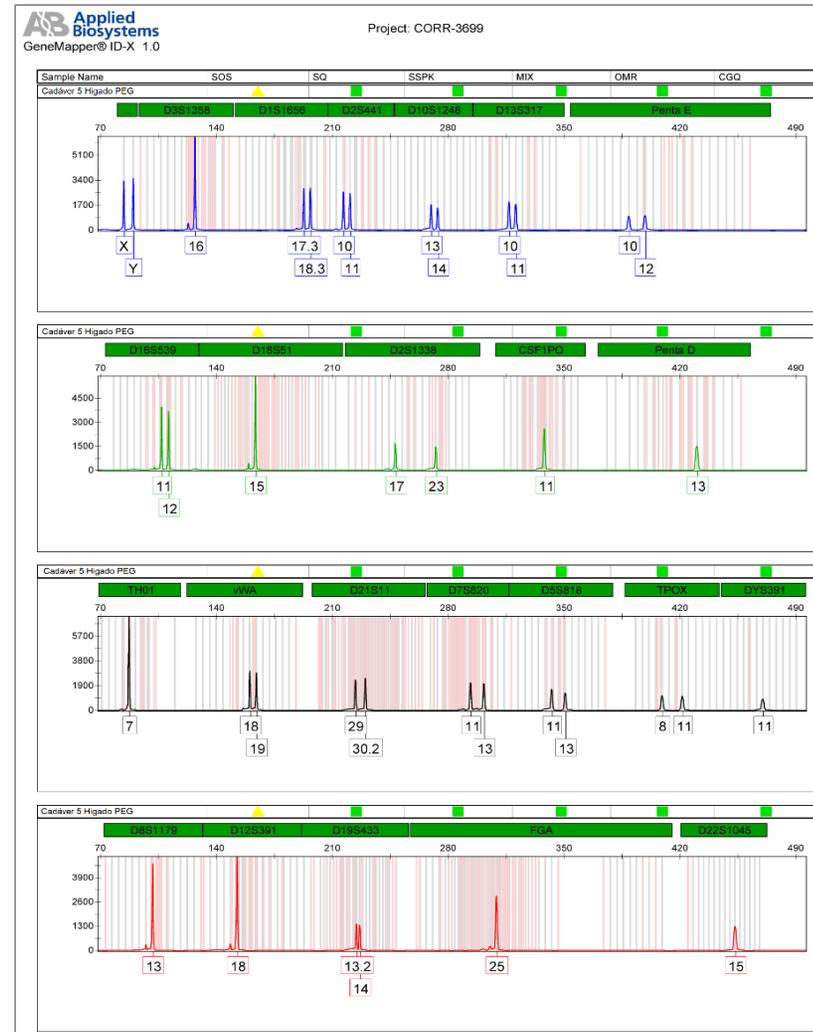
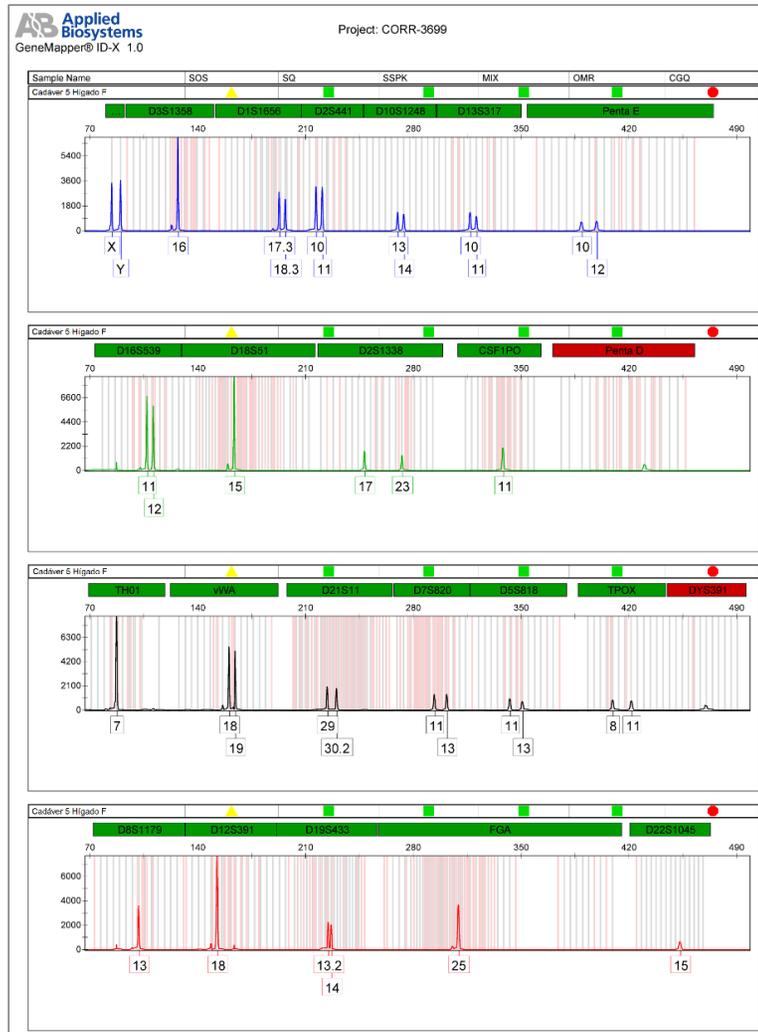


Figura 28. Calidad del ADN de tejidos incluidos en parafina. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido hepático del cadáver 5 fijado en formol (izquierda) y en PEG (derecha) e incluidos en bloques de parafina. Se observa que la fijación con formol degradó el ADN de alto peso molecular (>420 pb) imposibilitando la detección de 2 de los 24 marcadores del kit PP-F, mientras que la fijación con PEG no degradó el ADN permitiendo la detección de todos los marcadores del kit PP-F.

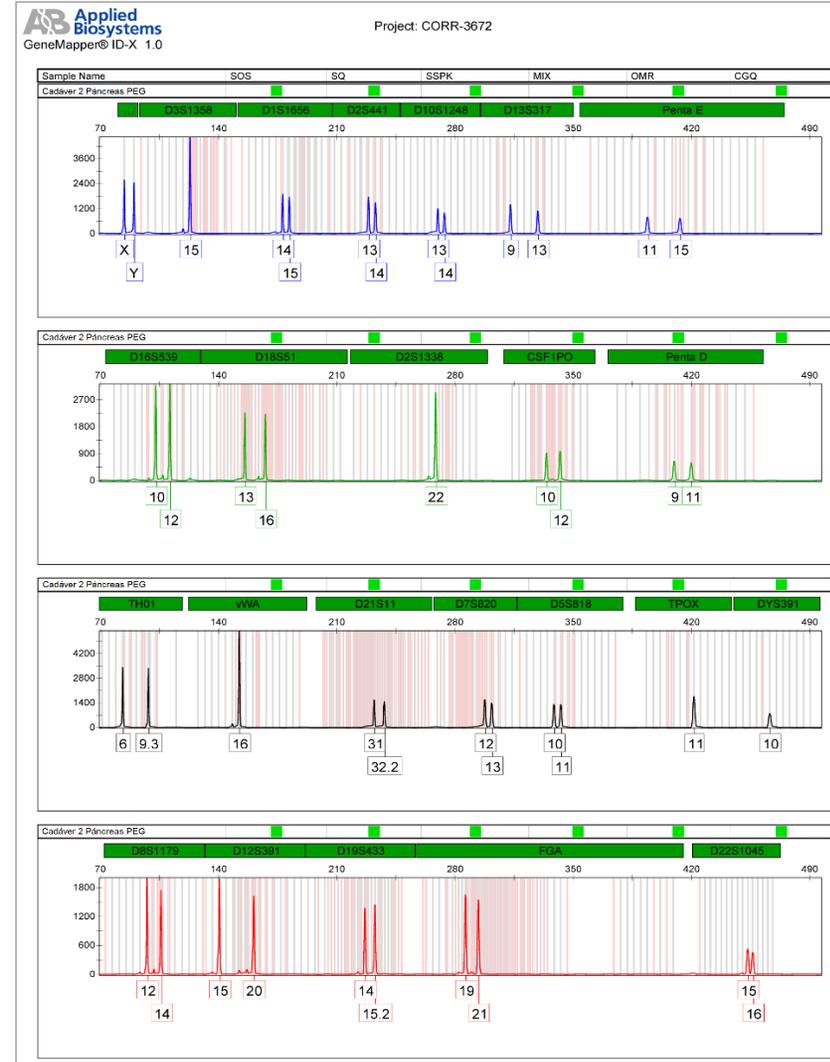
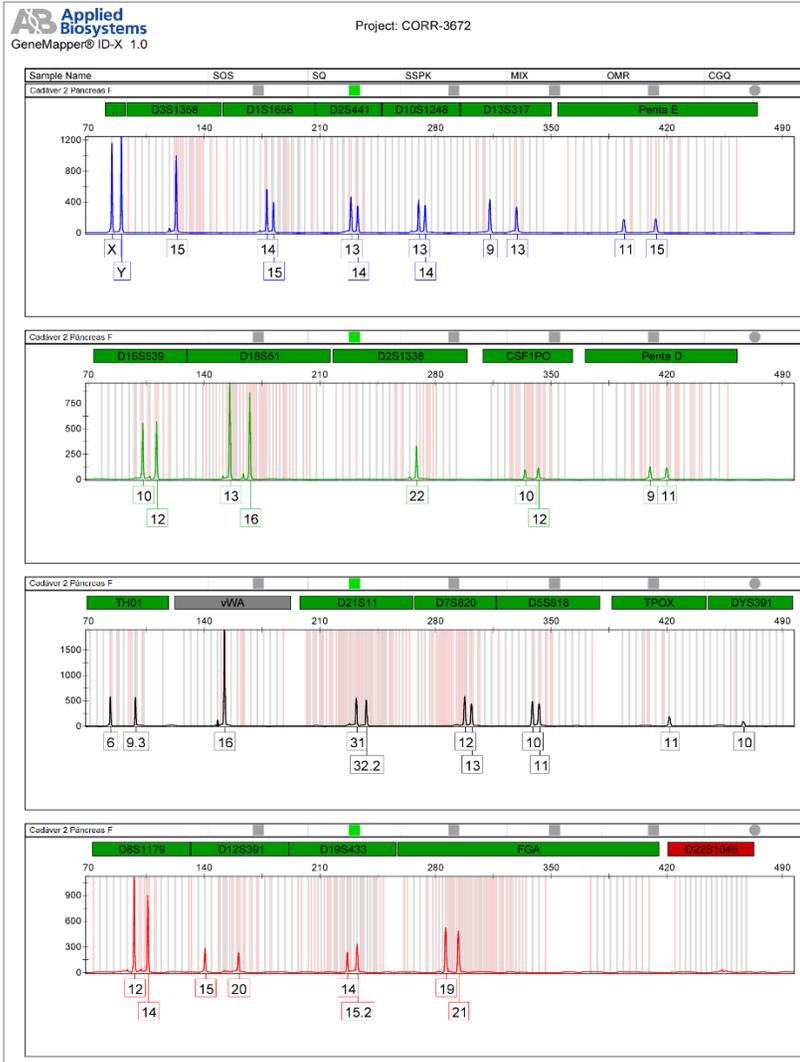


Figura 29. Calidad del ADN de páncreas incluido en parafina. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido pancreático del cadáver 2 fijado en formol (izquierda) y en PEG (derecha) e incluidos en bloques de parafina. Se observa que la fijación con formol degradó el ADN de alto peso molecular (>420 pb) imposibilitando la detección de 1 de los 24 marcadores del kit PP-F, mientras que la fijación con PEG no degradó el ADN permitiendo la detección de todos los marcadores del kit PP-F.

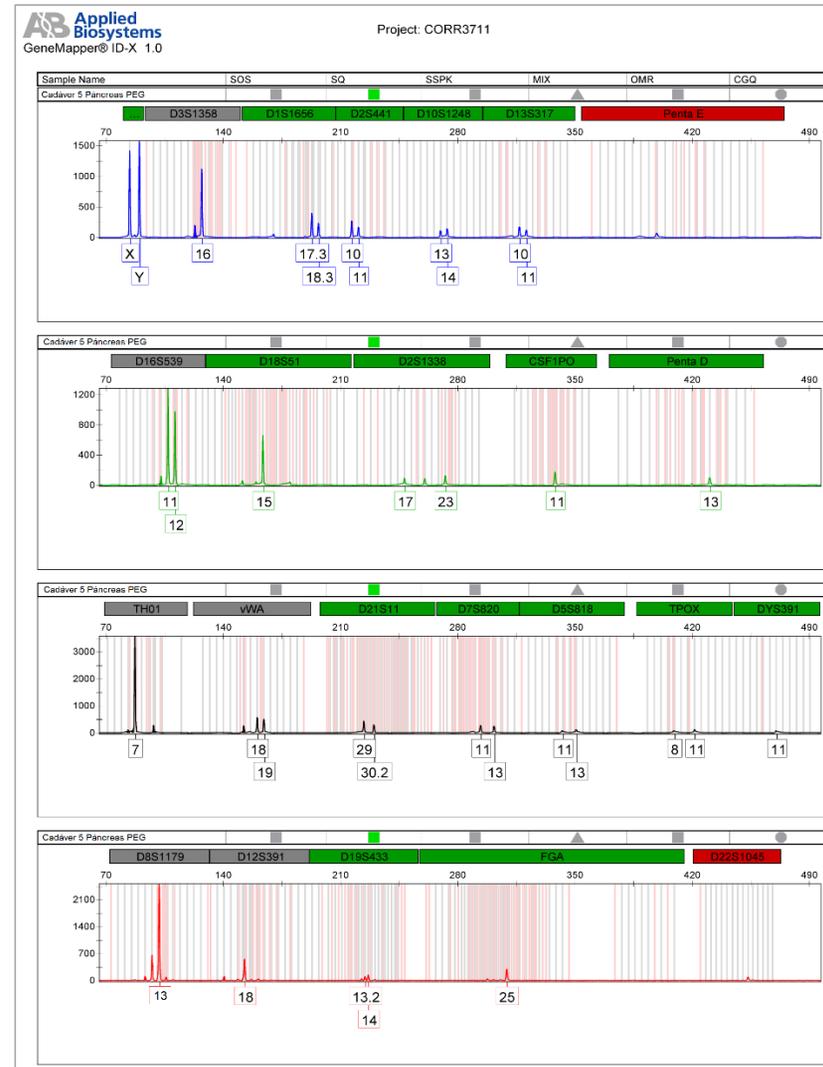
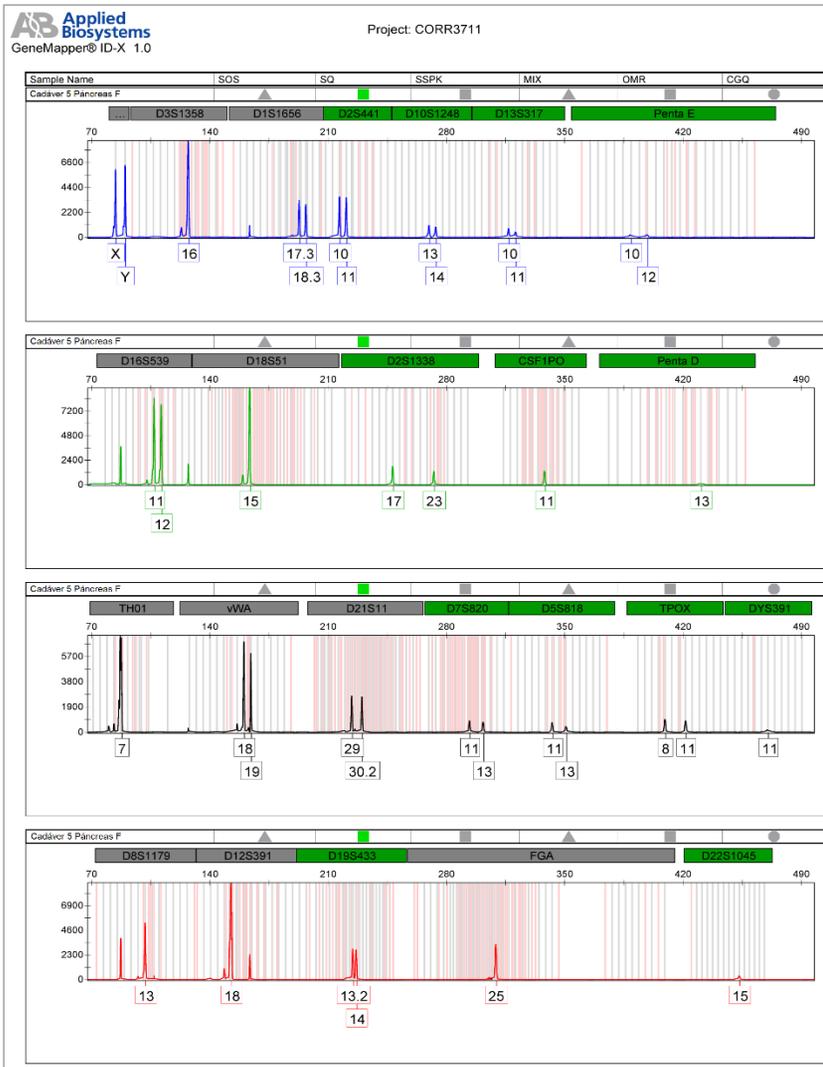


Figura 30. Calidad del ADN del páncreas en parafina. Se muestran los electroferogramas correspondientes al tejido pancreático del cádiver 5 fijado en formol (izquierda) y en PEG (derecha) e incluidos en bloques de parafina. Se observa que la fijación con formol degradó el ADN, sin embargo, permitió la detección de todos los marcadores del kit PP-F, mientras que la fijación con PEG degradó en mayor medida el ADN de 2 marcadores de 24 de alto peso molecular (>354.5 pb) del kit PP-F.

DISCUSIÓN

Estandarización

Tiempo óptimo de fijación del tejido

El tiempo óptimo de fijación del tejido se estableció con base en tres parámetros: Coloración y dureza del tejido, así como en la conservación histológica del mismo. Como se muestra en la Figura 14, los tejidos fijados en PEG (T2) muestran una coloración más similar a la del tejido en fresco (rojo), contrario a lo que sucede con los tejidos fijados en formol (T1), donde la coloración se torna amarillenta. El cambio en la coloración se dio más rápido en la fijación con formol (T1), ya que desde las 6 horas la coloración fue la misma, mientras que en la fijación con PEG (T2) a las 6 horas se aprecia una coloración semejante a la del tejido en fresco y a las 24 horas se aprecia una más pálida que fue la se observó en los otros tiempos de fijación que fueron puestos a prueba. Respecto a la dureza del tejido (no se muestran resultados), en ambos tratamientos de fijación los tejidos alcanzaron una dureza definitiva a las 24 horas, siendo el tejido fijado con PEG (T2) el que presentó mayor dureza. Finalmente, la conservación histológica del tejido fue valorada con la tinción de rutina y que permite visualizar y diferenciar las estructuras celulares: HE. Como se muestra en la Figura 15 no se aprecian diferencias en los cortes de músculo fijados con distintos tratamientos y tiempos, puesto que desde las 6 horas se pueden diferenciar las estructuras celulares del tejido como lo es el núcleo y las estrías de las fibras musculares. Con base en estos resultados, se determinó que el tiempo ideal de fijación eran 24 horas, pues a pesar que desde las 6 horas se aprecia un tejido completamente fijado en los cortes histológicos, la dureza y coloración definitiva se alcanzó hasta las 24 horas en ambos tratamientos de fijación. Cabe mencionar que a partir de las 24 horas las tres características de fijación ya no cambiaron para los subsecuentes tiempos de fijación en ambos tratamientos.

Degradación del ADN durante la fijación

Con base en los resultados de cuantificación de ADN, se determinó que la cantidad de material genético recuperado es dependiente al tiempo y tratamiento de fijación. En la Tabla 1 y Gráfica 1 se observa que la cantidad de ADN va disminuyendo conforme avanza el tiempo de fijación, además de que la fijación con PEG (T2) degrada en menor medida al ADN, permitiendo una mayor recuperación del mismo. La cuantificación del tejido en fresco se tomó como referencia para obtener los porcentajes de ADN recuperado en los distintos tiempos y tratamientos de fijación (Tabla 1), haciendo notar que la mayor pérdida de ADN se da dentro de las 6 primeras horas de fijación, ya que en la fijación con formol (T1) se pierde aproximadamente el 75%, mientras que en la fijación con PEG (T2) se pierde poco más de la mitad del material genético. Por su parte, a las 24 horas se tienen pérdidas de ADN de aproximadamente 98 y 93% en los T1 y T2 respectivamente; suponiendo así que la degradación del material genético es inmediata al entrar en contacto con el fijador. A partir

de las 24 horas de fijación la pérdida del material genético deja de ser drástica y se vuelve paulatina hasta prácticamente perder todo el ADN presente en la muestra (15 días de fijación).

Por otra parte, obtener cantidades de ADN no garantiza la obtención de perfiles genéticos completos. A pesar de que a las 24 horas se perdió más del 90% de ADN en ambos tratamientos de fijación, su calidad varió mucho, en la Figura 16 se muestran los perfiles genéticos pertenecientes a ambos tratamientos de fijación T1 y T2, donde claramente se puede apreciar que el formol degradó mucho más el ADN en dicho tiempo, ya que sólo se pudieron obtener marcadores genéticos de hasta 215.5 pb, mientras que en la fijación con PEG únicamente se perdió un marcador mayor a las 420 pb. En la Figura 17 se muestran los perfiles pertenecientes a una fijación de 5 días, y lo que se observa es que con el T1 prácticamente no hubo mayor degradación del ADN conforme a lo observado a las 24 horas, pues únicamente se perdieron un par de marcadores más, pero nuevamente el marcador más grande que se obtuvo fue de 215.5 pb, por su parte en el PEG sí se observa una mayor degradación conforme a las 24 horas, ya que ahora se perdieron 2 marcadores más, con tamaños superiores a 370 pb. Finalmente, en la Figura 18 se muestran los perfiles pertenecientes a los 15 días de fijación y se observa que el T1 ya degradó el ADN en su totalidad imposibilitando la obtención de los genotipos para todos los marcadores genéticos, mientras que en el PEG todavía se recuperan marcadores de hasta 215.5 pb obteniendo así perfiles parciales que si bien es cierto no son suficientes para una identificación certera, son de gran utilidad el estudio se complementa con otros sistemas de identificación genética como mini STR's, InDel's o marcadores de linaje.

Histopatología

Conservación histológica

La valoración que se realizó para calificar la conservación histológica de los tejidos, indica que de los 7 tejidos utilizados en el presente trabajo, en cinco de ellos (cardíaco, hepático, muscular, pulmonar y renal) se obtuvo una conservación igual a la obtenida con formol utilizando PEG como fijador, esto es, que si comparamos el detalle (forma) de las estructuras celulares y el arreglo histológico de las mismas se observa que ambos tejidos lucen iguales a pesar del método de fijación utilizado en cada uno de ellos (ver Figs. 19-23 y ANEXO I)

Por su parte, en el tejido nervioso se tiene una conservación "excelente" es decir, mejor a la esperada/observada con formol, esto debido a que si bien es cierto que en las preparaciones de encéfalo (Figs. 20 y 31, 32, 47, 48, 63 y 64 del ANEXO I) generalmente se observa una retracción de las neuronas debido a que los tejidos son provenientes de cadáveres (tejido en descomposición), en los tejidos que se fijaron con PEG (T2) se observa una menor retracción de las neuronas comparada con los tejidos provenientes del mismo cadáver fijados con formol, lo que nos habla de una mayor capacidad por parte del PEG de conservar la forma de las células en el tejido nervioso; esto puede deberse a que el PEG al ser un

polímero que penetra en el tejido, puede rellenar espacios celulares impidiendo así la retracción celular, lo cual también explica que el tejido adquiriera una mayor dureza si es fijado en PEG (T2) que en formol (T1).

Contrario a lo que sucede en encéfalo, el tejido pancreático sufre una mala conservación histológica si es fijado en PEG, en las Figuras 33, 34, 39, 40, 49, 50, 55, 56, 69 y 70 del ANEXO I se observa que cuando el tejido es fijado en formol (T1), el arreglo de los acinos pancreáticos y el detalle nuclear de cada célula acinar se conserva y es posible diferenciarlo (en tinción HE y PAS), mientras que en los tejidos fijados en PEG (T2) el detalle nuclear se pierde totalmente y no es posible su identificación (con ninguna tinción), así como también el arreglo histológico de los acinos se pierde y se observan las células con cierto grado de lisis. El páncreas se conforma de células acinares que producen, almacenan y liberan un gran número de enzimas, entre las que se encuentra la amilasa pancreática, lipasa pancreática, ribonucleasa, desoxirribonucleasa (ADNasa) y las proenzimas tripsinógeno, quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa y elastasa (Gartner y Hiatt, 2002), las cuales si son liberadas y no son inactivadas rápidamente pueden comenzar a lisar el propio tejido (autólisis). Una de las características del formol como fijador es que se une a grupos funcionales de las proteínas formando grupos hemiacetales, lo que provoca que las enzimas se inactiven evitando así la degradación del tejido por enzimas (Montuenga *et al.*, 2009), por su parte, el PEG al tratarse de un hidrocarburo no interacciona directamente con los grupos funcionales de las proteínas, por lo cual no inactiva a las enzimas, las cuales al ser liberadas comienzan a lisar el tejido. No se presentó una lisis total del tejido fijado con PEG puesto que la preparación de éste tratamiento (T2), se le agrega una pequeña cantidad de formol que, si bien es poca, puede que haya logrado frenar el lisado de todo el tejido pancreático, mediante la inactivación de enzimas. Debido a que en experimentos anteriores se comprobó que la fijación en ambos tratamientos se llevaba a cabo a la misma velocidad, la mala fijación del páncreas no se puede atribuir a la velocidad de penetración y fijación de cada uno de los fijadores, sino más bien a las propiedades de cada uno de ellos de inactivar enzimas que autolisen el tejido durante el proceso de fijación.

Calidad de las tinciones

En el caso de la tinción de rutina HE (Figs. 19 y 31-38 del ANEXO I), la intensidad de tinción de los colorantes no se ve afectada por el tipo de fijación al que fueron sometidos los tejidos, ya que en todos los cortes histológicos la intensidad de coloración se observa similar, sin embargo, el contraste entre los colorantes (hematoxilina y eosina) no es tan notorio en la fijación con PEG (T2), ya que en algunos tejidos lograr una clara distinción del citoplasma, núcleo y nucléolo se vuelve ligeramente complicada; particularmente en el caso de encéfalo (Figs. 31 y 32 del ANEXO I), sin embargo, esto no imposibilita su identificación. Es una tinción que permite observar el detalle nuclear de las células en todos los tejidos que se encuentran bien fijados (el detalle nuclear no se observa en tejido pancreático fijado con PEG (Fig. 34 del ANEXO I) ya que al haber una mala fijación los núcleos se lisaron el material nuclear

quedo disperso en el citoplasma tiñéndose junto con los componentes acidófilos del citoplasma imposibilitando la distinción entre unos y otros). De manera general la tinción HE no se ve afectada por la fijación en PEG.

En la tinción realizada con PAS (Figs. 20 y 39-46 del ANEXO I) los resultados obtenidos de coloración, contraste y detalles celulares fueron prácticamente los mismos para ambos tratamientos de fijación, sin embargo, la tinción purpura de las membranas basales, es más evidente (mayor coloración y contraste) en el tratamiento de fijación con PEG (Fig. 20). Es una tinción que al igual que la HE permite la identificación de las estructuras celulares y que con fijación en PEG se ve favorecida para la identificación de membranas basales.

Con la tinción tricrómica de Masson (Figs. 22 y 55-62 del ANEXO I) igualmente se obtuvieron resultados similares en ambos tratamientos de fijación en cuanto a la coloración y contraste de los colorantes, lo que permitió la identificación de las estructuras celulares de manera adecuada. De manera general ésta tinción no es utilizada para la identificación de las estructuras celulares, sino para la identificación de colágena madura, lo cual se ve favorecido por la fijación con PEG (T2) ya que como se aprecia en la Figura 22 la colágena se tiñó con una mayor intensidad comparada con la fijación en formol; en las Figura 55-58 del ANEXO I igualmente se aprecia una tinción más evidente de la colágena madura.

Para las tinciones ZN (Figs. 21 y 47-54 del ANEXO I) y Gram (Figs. 23 y 63-70 del ANEXO I) al ser tinciones dirigidas a la detección de bacterias, no se logró la observación histológica a detalle de cada uno de los tejidos. En el caso de la tinción ZN el azul de metileno tiñó a los núcleos celulares y es lo único que se aprecia teñido en las Figuras 21 y 52-54 (ANEXO I), imposibilitando la identificación de otras estructuras tisulares y celulares, cabe destacar que dicha coloración fue más intensa en los tejidos fijados en formol (T1), sin embargo, no es posible determinar si la tinción es favorecida o no con la fijación con PEG porque el objetivo de dicha tinción es la identificación de bacterias BAAR y el bacilo de la tuberculosis, las cuales son teñidas de color rojo-rosa. Por su parte, en la tinción Gram todo el tejido se observa teñido de coloración rojo-rosa debido a la safranina utilizada, por lo que no es posible apreciar con detalle las estructuras celulares. La coloración es menos intensa en las preparaciones fijadas con PEG (T2) comparadas con las de formol (T1) y por ello se tiene un menor contraste y detalle de las estructuras celulares, pero nuevamente no se puede calificar como buena o mala la tinción ya que su finalidad es la detección de bacterias G+ y G- y los tejidos utilizados eran negativos para ellas, aunque se espera que en ambas tinciones la fijación con PEG permita la tinción de las bacterias antes mencionadas y permitir así su detección.

Genética

Cantidad de ADN

Se compararon las cantidades de ADN obtenidas en ambos tratamientos de fijación T1 y T2 con las obtenidas en las muestras de referencia (tejido fresco) para de esta manera determinar cuál de los dos tratamientos de fijación degradaba menos el ADN y permitía la mayor recuperación de material genético. De acuerdo al análisis estadístico no existen diferencias significativas entre el ADN recuperado de las muestras de referencia (tejido fresco) y las del T2 (PEG), lo que indica que realizar la fijación con PEG y llevar a cabo la extracción de ADN a partir de bloques de parafina con un método automatizado como lo es AutoMate Express™ resulta equivalente a trabajar con muestras de tejido fresco que no han sufrido ningún tipo de tratamiento que pueda dañar al ADN. Por su parte, en los resultados obtenidos con la fijación del T1 (formol) sí existen diferencias significativas con los resultados de cuantificación del tejido fresco, lo que sugiere que el formol sí daña al ADN y por lo tanto disminuyen las cantidades que puedan ser recuperadas de una muestra.

El tejido que sufre una mayor pérdida de ADN durante los tratamientos de fijación es el muscular ya que, si se comparan las cantidades de ADN obtenidas del tejido en fresco con las obtenidas tanto en la fijación con formol y con PEG (ver Tablas 4 y 5 y Gráficas 2, 3 y 4), se observa que es el tejido donde se recuperan menos cantidades de ADN después de la fijación, lo que supone que el músculo es un tejido que soporta poco los procesos de fijación. En el tejido pancreático sucede algo similar, posterior al procedimiento de fijación se obtienen cantidades pequeñas de ADN, sin embargo, las cantidades iniciales (tejido de referencia) no son tan altas como las obtenidas en el tejido muscular, lo que representa una menor pérdida de material genético.

Por el contrario, en algunos de los tejidos fijados con PEG se obtuvieron mayores cantidades de ADN que en la muestra de referencia (nervioso, hepático y renal) (ver Tablas 4 y 5 y Gráficas 2, 3 y 4), esto se puede explicar debido a que las muestras problema (BP fijados con cualquier tratamiento) fueron trabajadas con un sistema automatizado que garantiza una mayor recuperación de ADN durante la extracción comparado con el método manual (buffer de lisis y purificación con sílica) que fue utilizado que, aunque es un método que permite recuperar buenas cantidades de ADN (20-51% de ADN total de la muestra), la pérdida de material genético por la manipulación siempre está presente en este tipo de metodologías, por lo que a pesar de tener degradación por el tratamiento de fijación, la metodología de extracción automatizada permitió recuperar mayores cantidades de material genético.

A pesar de que el PEG preserve mayores cantidades de ADN en los tejidos, no lo hace en órganos que contienen una gran cantidad de enzimas como lo es el páncreas, ya que en tres de los 4 páncreas trabajados se obtuvieron mayores cantidades de ADN en aquellos fijados con formol (T1) que con PEG (T2) (ver Tablas 4 y 5 y Gráficas 2, 3 y 4), fenómeno que es

debido a lo explicado con anterioridad: que el formol inhibe la acción enzimática evitando así el proceso de autólisis y el PEG al no detener dicho proceso tan rápido como lo hace el formol, son las propias enzimas las que degradan el material genético. El grado de autólisis no sólo dependerá del fijador, sino que también lo hará del tiempo *post mortem* del cadáver, ya que mientras más tiempo haya transcurrido desde su muerte hasta antes de la fijación el grado de autólisis será mayor. Esto probablemente es lo sucedido en los páncreas de los cadáveres 3, 4 y 5 de los cuales se recuperaron cantidades mínimas de ADN (no mayores a 2.5 ng/μl) contrario al páncreas del cadáver 2 en el cual se obtuvieron cantidades de más de 4 ng/μl en formol y más de 29 ng/μl con PEG. Esto puede indicar que el tiempo *post mortem* del cadáver 2 es menor al de los cadáveres 3, 4 y 5, en los cuales claramente hubo mayor grado de autólisis antes del proceso de fijación y por ende menores cantidades de ADN.

Calidad de ADN

La degradación del ADN se observa en la disminución del tamaño de los picos de cada alelo (número de RFU) manifestándose en los marcadores genéticos más pesados o con mayor número de pares de bases. Los marcadores más pequeños (en pb) son los que presentan un mayor número de RFU lo que indica que hay mayores cantidades de ADN para ese marcador, mientras que para los marcadores con tamaños más grandes, se obtiene un menor número de RFU debido a que el ADN de alto peso molecular (mayor a 350 pb) es el primero en degradarse o fragmentarse, quedando así pocas copias de ADN, lo que imposibilita obtener resultados de marcadores de ese tamaño. En la Figura 26 se observa claramente la degradación anteriormente descrita, en el perfil del BP-T1 (izquierda) se observa que, en los primeros marcadores los picos de cada alelo son grandes y conforme avanza el número de pares de bases, el tamaño de los picos o alelos disminuye. Un perfil sin degradación es como se observa en el BP-T2 (derecha), donde sin importar el marcador, el tamaño de los picos de los alelos se mantiene de un tamaño similar (esto aplica en alelos heterocigotos, ya que los alelos homocigotos siempre serán más grandes).

Con respecto a la calidad del ADN, como se puede ver en la Tabla 6 y en las Figuras 25-28, el material genético sufrió una mayor degradación cuando la fijación se realizó con el T1 (formol) que con el T2 (PEG). De la totalidad de los tejidos trabajados en cada tratamiento, se logró obtener el perfil genético completo de 12/28 tejidos que fueron fijados con formol, mientras que de los tejidos fijados con PEG se obtuvo el perfil genético completo de 26/28 de ellos, lo que nos indica que la calidad del ADN es mejor cuando el tejido es fijado en PEG, ya que no degrada ADN de alto peso molecular y permite la detección de todos los marcadores del kit. Por otra parte, la degradación del ADN es evidente para el caso de las muestras de BP-T1 debido a que se logró obtener el perfil completo de poco menos de la mitad de la totalidad de las muestras, lo que hace evidente que la fijación con formol daña al ADN impidiendo su genotipificación.

Los dos perfiles genéticos parciales que se obtuvieron de BP-T2 pertenecen a tejido pancreático (cadáveres 2 y 5), dónde incluso se obtuvieron mejores resultados en los tejidos de BP-T1; esto va en relación con lo anteriormente discutido para la cantidad de ADN obtenido en páncreas y que tiene que ver con el tiempo *post mortem* del cadáver antes de la fijación y la autólisis que se lleva a cabo durante ese tiempo. Como se observa en el páncreas del cadáver 2 (Fig. 29), el cual se presupone sufrió menos autólisis por tener menos tiempo *post mortem*, en la fijación con formol, únicamente se perdió un marcador, mientras que con PEG se logra obtener un perfil genético completo y sin degradación; por su parte, del páncreas del cadáver 5 (Fig. 30) del tejido de BP-T1, a pesar de que se logró obtener un perfil completo, el ADN se encuentra altamente degradado de acuerdo a los niveles de RFU registrados y en el BP-T2 se perdieron dos marcadores con peso molecular mayor a los 350 pb además de que el resto de los marcadores se observan de igual manera degradados.

Cómo se muestra en la Tabla 6, el marcador que sufre mayor degradación es el D22S1045 (420-472 pb) que, a pesar de no ser el marcador más grande con el que cuenta el kit representa el 28.12% del total de los marcadores que no se lograron detectar, en segundo lugar se encuentra el marcador DYS391 (443.6-495 pb) con 20.3%, seguido de los marcadores Penta D (370-461 pb) y Penta E (354.5-479.9 pb) con un 12.5% y 10.93% respectivamente. Gracias a esto es posible ver, que los marcadores que primero se pierden son aquellos mayores a los 350 pb, es decir ADN de alto peso molecular, lo que comprueba que es el primero en sufrir degradación.

CONCLUSIONES

- La velocidad de fijación del PEG resulta similar a la fijación con formol, siendo las 24 horas el tiempo adecuado en el que se termina el proceso de fijación en ambos tratamientos, alcanzando los niveles de coloración y dureza necesarias. El tiempo de fijación mencionado funciona para fragmentos pequeños de tejido con superficie no mayor a 5 cm² y con grosor aproximado de 0.5 cm.
- El PEG conserva adecuadamente las características histológicas del tejido si se utiliza como fijador, comparado con un fijador de uso rutinario como lo es el formol. Puede ser empleado en la mayoría de los tejidos, excepto el pancreático si es que éste proviene de un cadáver con más de 6 horas aproximadas de tiempo *post mortem*.
- La fijación con PEG no interviene con los procedimientos de tinción histológica, ya que permite la coloración de las estructuras de acuerdo a cada uno de los colorantes utilizados e incluso favorece la coloración de algunos de ellos sobre las estructuras celulares. Las diferencias en coloración que pueden llegar a presentarse respecto a la fijación con formol no impiden la identificación de las estructuras celulares y tisulares.
- La recuperación de ADN se ve significativamente favorecida cuando el tejido es fijado con PEG e incluso es equiparable a las cantidades de ADN que se recuperan cuando se trabajan muestras de tejido fresco.
- El uso de PEG degrada más lentamente al ADN comparado con la velocidad en la que lo degrada el formol. Su uso como fijador permite la detección de perfiles genéticos completos si la muestra es fijada por 24 horas y no presenta un largo periodo *post mortem* o altos grados de autólisis, además de que permite la recuperación de perfiles genéticos con más del 80% de los marcadores con un tiempo de fijación de 5 días. La obtención de perfiles parciales, resultado de un largo tiempo de fijación, resultan útiles en el proceso de identificación siempre y cuando se complementen con otros sistemas de identificación genética.
- La naturaleza del tejido determina en gran medida la degradación del ADN, aquellos tejidos altamente enzimáticos provocarán un mayor grado de autólisis si la fijación del tejido no es rápida posterior al intervalo *post mortem*.

PERSPECTIVAS

- Eliminar el uso de formol en la fórmula utilizada en la preparación del PEG, para rectificar que el PEG cumple con las características de fijador ya sin el uso del formol.
- Realizar ensayos enzimáticos en el tejido pancreático que ayuden a esclarecer si las causas de la rápida degradación del ADN en dicho tejido son debidas a las enzimas propias del tejido.
- Llevar a cabo ensayos de recuperación de ADN a partir de cortes de 3 μm de espesor de tejido fijado con PEG. Esto debido a que en ocasiones una preparación histológica teñida es lo único que preservan los laboratorios forenses y sobre la cual es necesaria la identificación genética.
- Utilizar el PEG en la fijación de evidencias forenses (raspados de uñas, por ejemplo), las cuales por lo general cuentan con cantidades mínimas críticas de material genético.
- La implementación del PEG como fijador abre la puerta para un amplio rango de posibilidades de estudios de biología molecular en los cuales se requiera analizar muestras incluidas en parafina.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2015) *Molecular Biology of The Cell*. New York, USA: Garland Science.
- Álvarez, R. (2007) *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. España: Díaz de Santos.
- Baird, M. (1996) *Use of DNA Identification for Forensic and Paternity Analysis*. Journal of Clinical Laboratory Analysis 10: 350-358.
- Baust, J. (2008) *Strategies for the Storage of DNA*. Biopreservation and Biobanking 6: 251-252. doi: [10.1089/bio.2008.0604.lett](https://doi.org/10.1089/bio.2008.0604.lett)
- Bessetti, J. (2007) *An Introduction to PCR Inhibitors*. Profiles in DNA: Promega Corporation.
- Blanco, F., Cañete, J. y Pablos, J. (2007) *Monografías SER. Técnicas de Investigación Básica en Reumatología*. Madrid, España: Médica Panamericana S. A.
- Burcu, D., Hazer, B. y Dinçer, N. (2011) *Soft Tissue Response to the Presence of Polypropylene-G-Poly(ethylene glycol) Comb-Type Graft Copolymers Containing Gold Nanoparticles*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol (2011): 1-7. doi.org/[10.1155/2011/956169](https://doi.org/10.1155/2011/956169)
- Burguete, N., Martínez de la Cruz, B., Camacho, R., Santana, C., Noris, G., López, E., Arellano, J., Majluf, A., Meraz, M. y Gómez, R. (2015) *Forensic-paternity effectiveness and genetics population analysis of six non-CODIS mini-STR loci (D1S1656, D2S441, D6S1043, D10S1248, D12S391, D22S1045) and SE33 in Mestizo and Amerindian populations from Mexico*. Annals of Human Biology. doi: [10.3109/03014460.2015.1127424](https://doi.org/10.3109/03014460.2015.1127424)
- Buttler, J. (2005) *Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. California, USA: Elsevier Academic Press.
- Buttler, J. (2009) *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. California, USA: Elsevier Academic Press.
- Buttler, J. (2011) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. California, USA: Elsevier Inc.
- Canavos, G. (1988) *Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y métodos*. México: McGraw Hill Interamericana de México.
- Casado, M. y Guillén, M. (2014) *ADN forense: Problemas éticos y jurídicos*. Barcelona, España: Edicions Universitat Barcelona.
- Dettmeyer, R. (2011) *Forensic Histopathology. Fundamentals and Perspectives*. Berlin, Alemania: Springer.
- Divne, A., Nilsson, M., Calloway, C., Reynolds, R., Erlich, H. y Allen, M. (2005) *Forensic Casework Analysis Using the HVI/HVII mtDNA Linear Array Assay*. Journal of Forensic Sciences Vol. 50 (3): 548-554.

- Gao, K. y Godkin, J. (1991) *A New Method for Transfer of Polyethylene Glycol-embedded Tissue Sections to Silanated Slides for Immunocytochemistry*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol. 39 (4): 537-540.
- García, P., Benavente, F., Melo, A., Roa, I. y Roa, J. (2006) *Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores*. Revista Español Patología Vol. 39 (3): 175-179. doi:10.1016/S1699-8855(06)70034-4
- Gartner, L y Hiatt, J. (2002) *Texto Atlas de Histología*. Chile: McGraw Hill Interamericana Editores.
- Gibbons, J. y Chakraborti, S. (2003) *Nonparametric Statistical Inference. Fourth Edition, Revised and Expanded*. New York, USA: Marcel Dekker, Incorporation.
- Goodwin, W., Linacre, A. y Hadi, S. (2011) *An Introduction to Forensic Genetics*. Hoboken, USA: Wiley-Blackwell.
- Graham, E., Turk, E. y Ruddy, G. (2007) *Room temperature DNA preservation of soft tissue for rapid DNA extraction: An addition to the disaster victim identification investigators toolkit?* Forensic Science International: Genetics 2: 29-34. doi: 10.1016/j.fsigen.2007.07.003.
- Guerra, I. y Aguirre, J. (2009) *Conservación de muestras y documentos en Anatomía Patológica*. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. 231-234.
- Hebda, L. (2013). *Isolation and Analysis from Skeletal Remains: Evaluating the Utility of Soil DNA Extraction Kits* (Master). Michigan.
- Jobling, M. y Gill, P. (2004) *Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis*. Nature reviews Genetics. Vol. 5: 739-751 pp. doi:10.1038/nrg1455
- Juez, P. y Diez, F. (1997) *Probabilidad y estadística en Medicina. Aplicaciones en la práctica clínica y en la gestión sanitaria*. Madrid, España: Diez de Santos.
- Lee, S., McCord, B. y Buel, E. (2014) *Advances in Forensic DNA Quantification: A Review*. Electrophoresis 35: 3044-3052. doi: 10.1002/elps.201400187
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014) *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Investigación en discapacidad. Vol. 3 (1): 10-18.
- Lowe, J. y Anderson, P. (2015) *Stevens y Lowe. Histología humana*. Barcelona, España: Elsevier España.
- Martínez, R. y Gragera, R. (2008) *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC).
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. (2015) *Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas histológicas*. España: Universidad de Vigo.
- Merkel, A. y Gemmell, N. (2008) *Detecting short tandem repeats from genome data: opening the software black box*. Briefings in bioinformatics. Vol. 9(5): 355-366. doi:10.1093/bib/bbn028
- Montuenga, L., Ruiz, F. y Calvo, A. (2009) *Técnicas en Histología y Biología Celular*. Barcelona, España: Elsevier Masson.

- Moncho, J. (2015) *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. Barcelona, España: Elsevier.
- Nishiguchi, M., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, A., Prendini, L., Rosenbaum, H., Torres, E. Wyner, Y., De Salle, R. y Giribet, G. (2002) *DNA Isolation Procedures en: Methods and Tools in Biosciences and Medicine Techniques in molecular systematics and evolution*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel.
- Pardo, F. (1998) *Compendio de anatomía patológica*. Madrid, España: Harcourt Brace Publishers International.
- Peral, P., Giovambattista, G. y Ripoli, M. (2015) *Genética Forense No-Humana*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
- Pereira, R., Phillips, C., Alves, C., Amorim, A., Carracedo, A. y Gusmaño, L. (2009) *A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms*. *Electrophoresis* 30: 3682-3690. doi:10.1002/elps.200900274
- Prahlow, J. y Byard, R. (2012) *Atlas of Forensic Pathology*. New York, USA: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-61779-058-4
- Rapley, R. y Whitehouse, D. (2007) *Molecular Forensics*. London, England: John Wiley & Sons.
- Rial, A. & Varela, J. (2008) *Estadística práctica para la investigación en ciencias de la salud*. España: Netbio.
- Rivero, E., Neves, A., Silva-Valenzuela, M., Sousa, S. y Nunes, F. (2006) *Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. *Pathology Research and Practice* 202: 523-529. doi:10.1016/j.prp.2006.02.007
- Ruitberg, C., Reeder, D. y Butler, J. (2001) *STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community*. *Nucleic Acids Research* Vol. 29 (1): 320-322.
- Salazar, A., Sandoval, A. y Borunda, J. (2011) *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Ciudad de México, Mexico: Mc Graw Hill Interamericana Editores.
- Sandoval, E. (2005) *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Cd. Mx, México: Instituto de Biología, UNAM.
- Santos, S., Sá, D., Bastos, E., Guedes-Pinto, H., Gut, I., Gärtner, F. y Chaves, R. (2009) *An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues*. *Research in Veterinary Science* 86: 421-426. doi:10.1016/j.rvsc.2008.08.007
- Sato, M., Kojima, M., Kawano, A., Nakamura, Y., Saito, N. y Ochiai, A. (2014) *Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories. A comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays*. *Pathology International* 64: 209-216. doi:10.1111/pin.12164
- Sepúlveda, J. (2011) *Histología: biología celular y tisular instructivo de laboratorio. Instructivo de laboratorio*. México: Mc Graw Hill Interamericana.

- Smithson, K., MacVicar, B. y Hatton, G. (1983) *Polyethylene glycol embedding: a technique compatible with immunocytochemistry, enzyme histochemistry, histofluorescence and intracellular staining*. Journal of Neuroscience Methods (7): 27-41.
- Sriramachari, S. y Ramalingaswami, V. (1952) *Polyethylene glycols as embedding media in histochemical work*. Journal Clinical Pathology (5):345-349.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo C. (2013) *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en discapacidad Vol. 2 (2): 70-78.
- Tilstone, W., Savage, K. y Clark, L. (2006) *Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques*. California, USA: ABC-CLIO.
- Van Pelt, E., van Belkum, A. y Hays, J. (2008) *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. USA: Springer.
- Wackerly, D., Mendenhall, W. y Scheaffer (2008) *Mathematical Statistics with Applications*. California, USA: Thomson Brooks/Cole.
- Willems, T., Gymrek, M., Highnam, G., The 1000 Genomes Project Consortium, Mittelman, D. y Erlich, Y. (2014) *The landscape of human STR variation*. Genome Research 24: 1894-1904. doi:10.1101/gr.177774.114
- Welsch, U. y Sobotta, J. (2008) *Histología*. Madrid, España: Medica Panamericana.
- Wong, E. (2010) *¿Después de un análisis de varianza...qué? Ejemplos en ciencias de alimentos*. Agronomía mesoamericana 21(2):349-356.
- Zidkova, A., Horinek, A., Kebrdlova, V. y Korabecna, M. (2013) *Application of the new insertion-deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech Population*. International Journal of Legal Medicine (127): 7-10. doi: 10.1007/s00414-011-0649-3

Sitios electrónicos

- Montalvo, C. (2010) *Tinción Histológica*. Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. [En línea] Fecha de consulta: 03 junio 2016. Disponible en: http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
- Promega Corporation (2016) *Technical Manual. PowerPlex® Fusion System*. [En línea] Fecha de consulta: 26 mayo 2016. Disponible en: <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/101/PowerPlex%20Fusion%20System%20Protocol.pdf>
- Related Keywords and Suggestions* [En línea] Fecha de consulta: 30 mayo 2016. Disponible en: <http://www.suggest-keywords.com/>

ANEXOS

ANEXO I. TINCIONES HISTOLÓGICAS

Hematoxilina-Eosina (H-E)

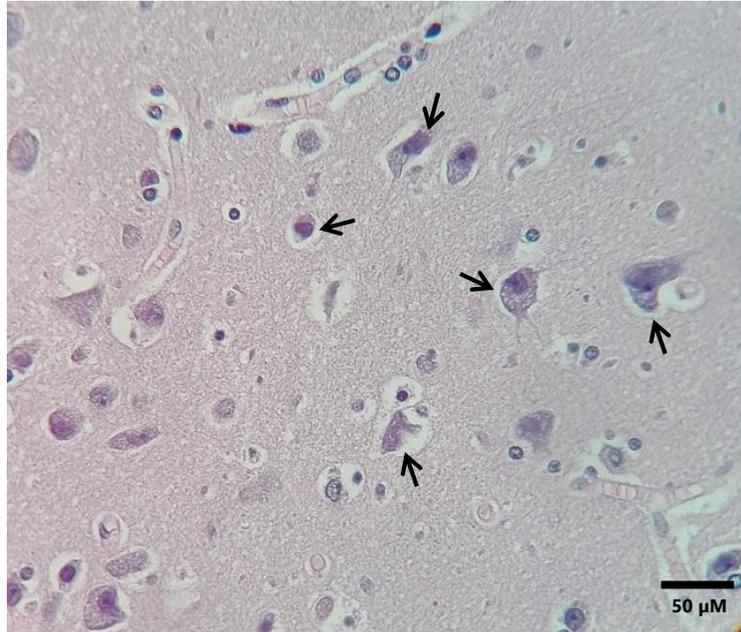


Figura 31. Encéfalo T1 HE. Corte de encéfalo fijado con el T1 (formol), se aprecian neuronas (*flechas*) con núcleos bien definidos, pero con una gran retracción celular en todas ellas (40x).

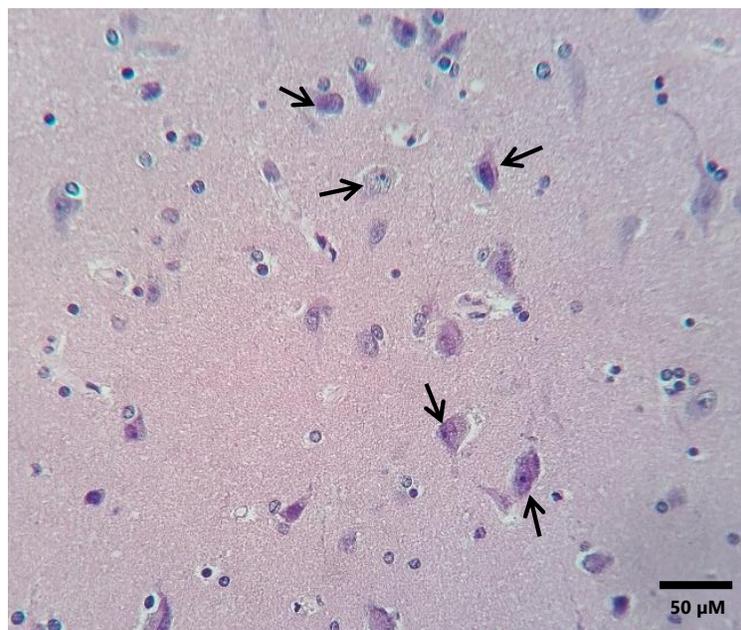


Figura 32. Encéfalo T2 HE. Corte de encéfalo fijado con el T2 (PEG), se aprecian neuronas (*flechas*) con núcleos poco definidos. Las neuronas presentan muy poca o nula retracción celular (40x).

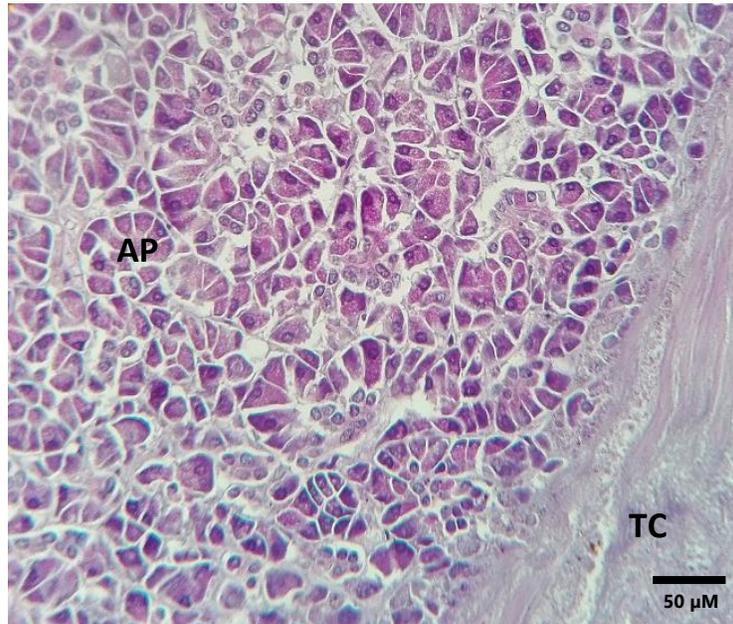


Figura 33. Páncreas T1 HE. Corte de páncreas fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de los acinos pancreáticos (AP) con sus núcleos celulares bien definidos. En la parte inferior izquierda se observa tejido conjuntivo (TC) (40x).

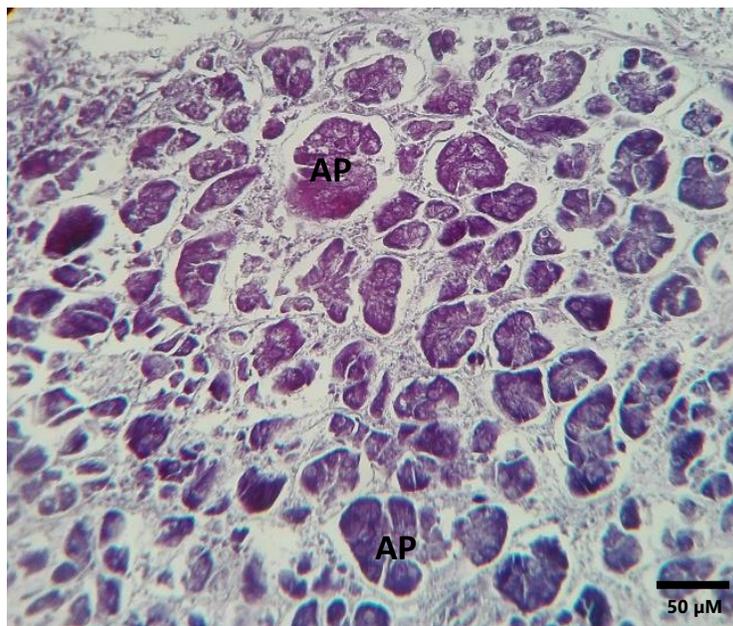


Figura 34. Páncreas T2 HE. Corte de páncreas fijado con el T2 (PEG), se aprecia el arreglo de los acinos pancreáticos (AP) teñidos en morado, pero el detalle celular y nuclear de cada uno de ellos se perdió debido a una mala fijación (40x).

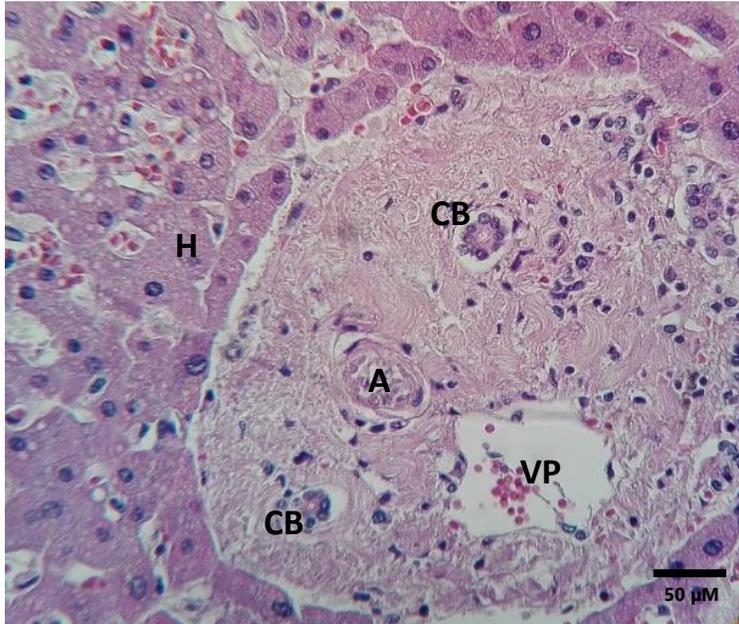


Figura 35. Hígado T1 HE. Corte de hígado fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de una triada hepática (vena porta (VP), arteria (A) y conductos biliares (CB)) rodeado de hepatocitos (H) dispuestos en cordones. Los núcleos celulares se encuentran bien definidos por la tinción (40x).

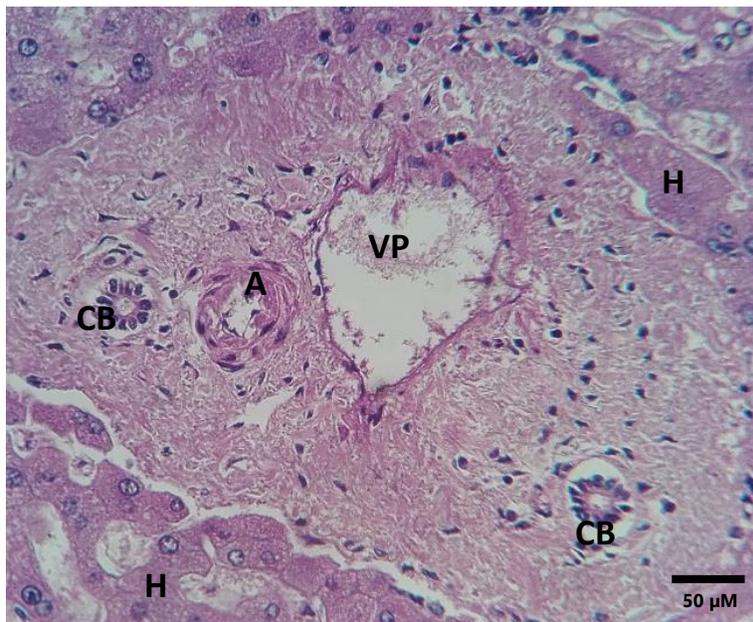


Figura 36. Hígado T2 HE. Corte de hígado fijado con el T2 (PEG), se aprecia el arreglo de una triada hepática (vena porta (VP), arteria (A) y conductos biliares (CB)) rodeado de hepatocitos (H) dispuestos en cordones. Los núcleos celulares se encuentran bien definidos por la tinción (40x).

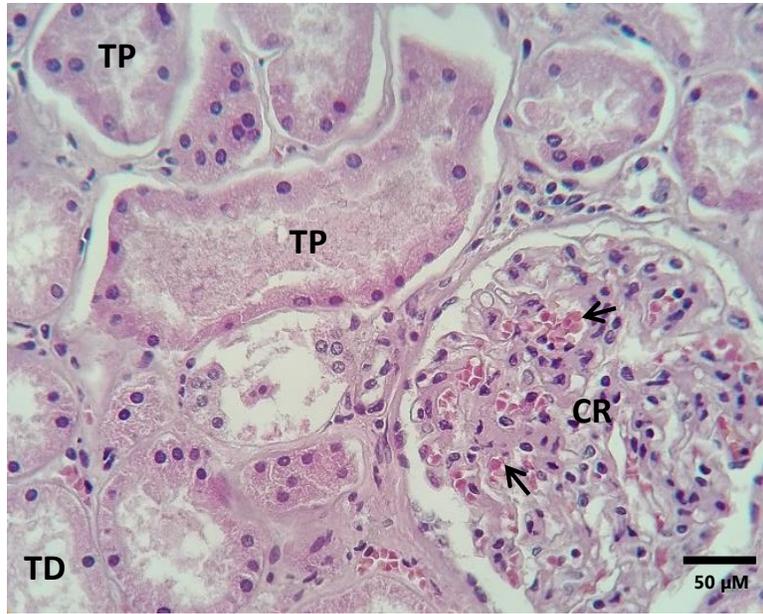


Figura 37. Riñón T1 HE. Corte de riñón fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de un corpúsculo renal (**CR**), túbulos contorneado proximales (**TP**) y distales (**TD**) y vasos sanguíneos con eritrocitos (**flechas**). Los núcleos celulares de los podocitos y de las células de los túbulos contorneados se encuentran bien definidos por la tinción (**40x**).

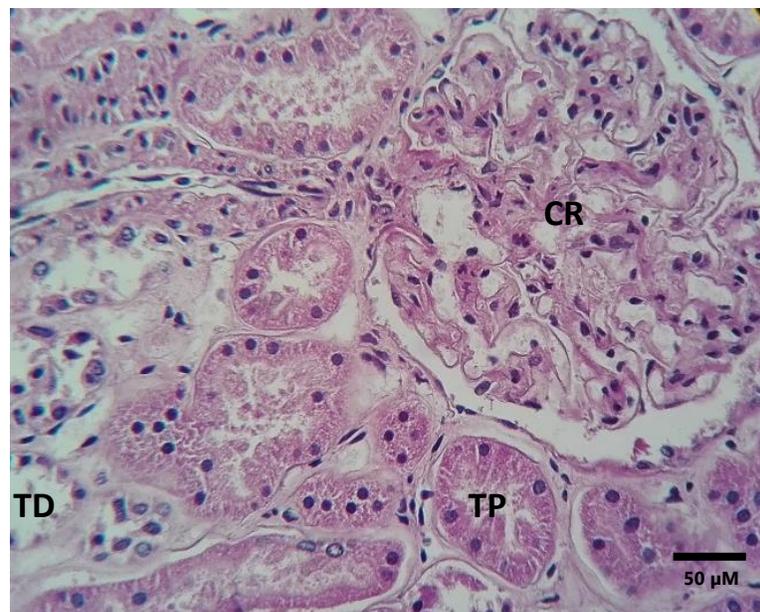


Figura 38. Riñón T2 HE. Corte de riñón fijado con el T2 (PEG), se aprecia el arreglo de un corpúsculo renal (**CR**), túbulos contorneado proximales (**TP**) y distales (**TD**). Los núcleos celulares de los podocitos y de las células de los túbulos contorneados se encuentran bien definidos por la tinción (**40x**).

Tinción de Schiff (PAS)

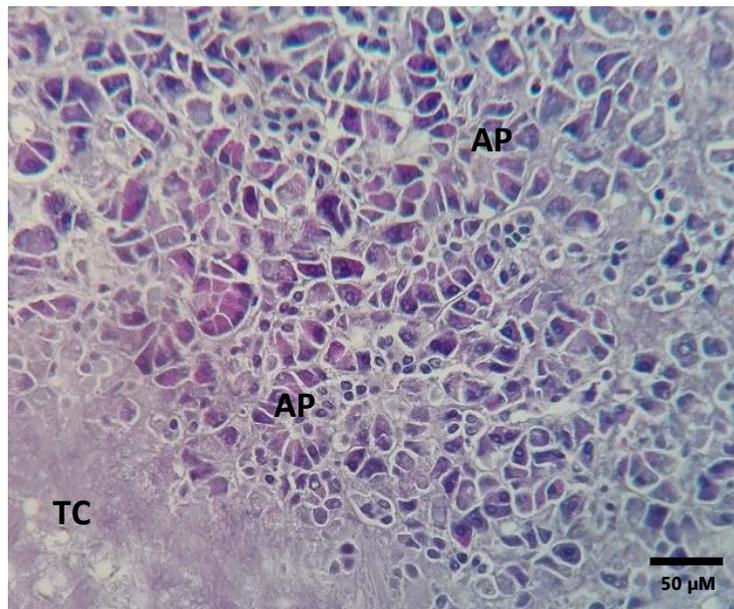


Figura 39. Páncreas T1 PAS. Corte de páncreas fijado con el T1 (formol), el arreglo de los acinos pancreáticos (AP) no se encuentra bien definido, sin embargo, la diferenciación de sus núcleos celulares es posible gracias a la tinción. En la parte superior izquierda se observa tejido conjuntivo (TC) (40x).

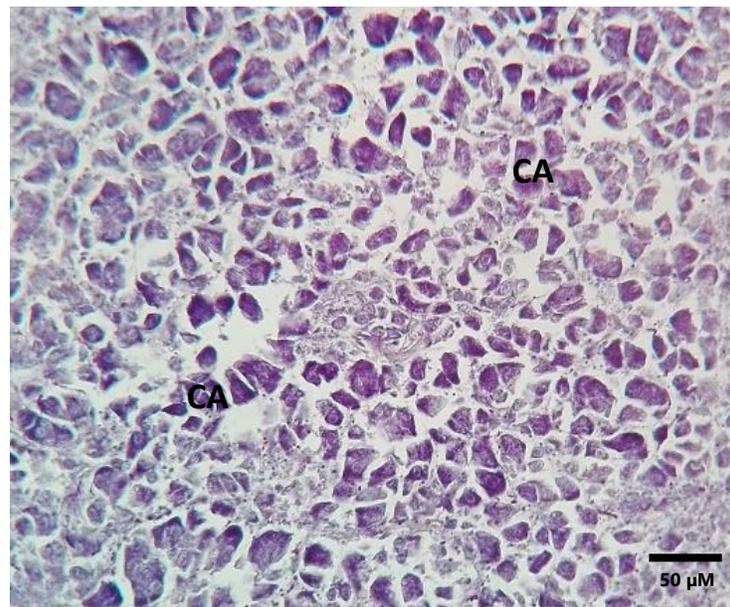


Figura 40. Páncreas T2 PAS. Corte de páncreas fijado con el T2 (PEG), las celular acinares (CA) perdieron el arreglo en acinos pancreáticos, así como tampoco se aprecia el detalle nuclear de cada célula, debido a una mala fijación del tejido (40x).

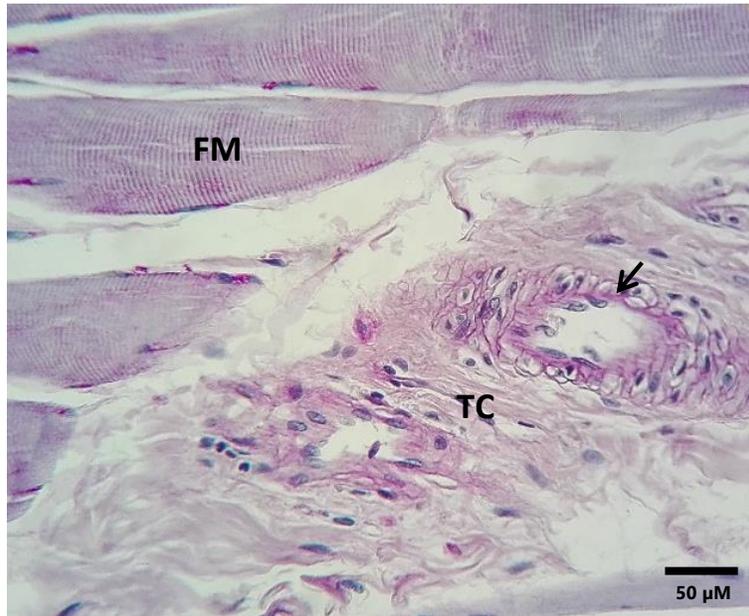


Figura 41. Músculo T1 PAS. Corte de músculo fijado con el T1 (formol), se aprecian fibras musculares (FM) en corte longitudinal, se destaca la tinción en púrpura de la membrana basal (flecha) de una arteria rodeada de tejido conjuntivo (TC). Los núcleos celulares se encuentran teñidos de morado-azul (40x).

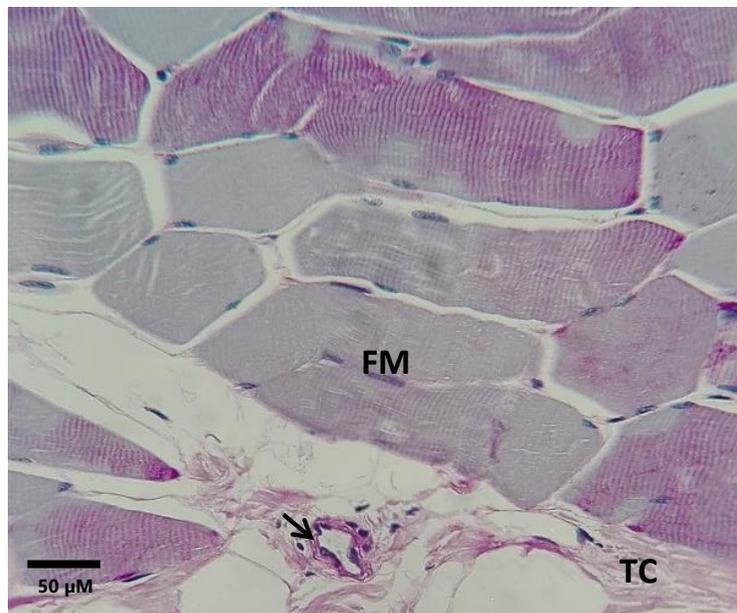


Figura 42. Músculo T2 PAS. Corte de músculo fijado con el T2 (PEG), se aprecian fibras musculares (FM) en corte longitudinal, se destaca la tinción en púrpura de la membrana basal (flecha) de una arteriola rodeada de tejido conjuntivo (TC). Los núcleos celulares se encuentran teñidos de morado-azul (40x).

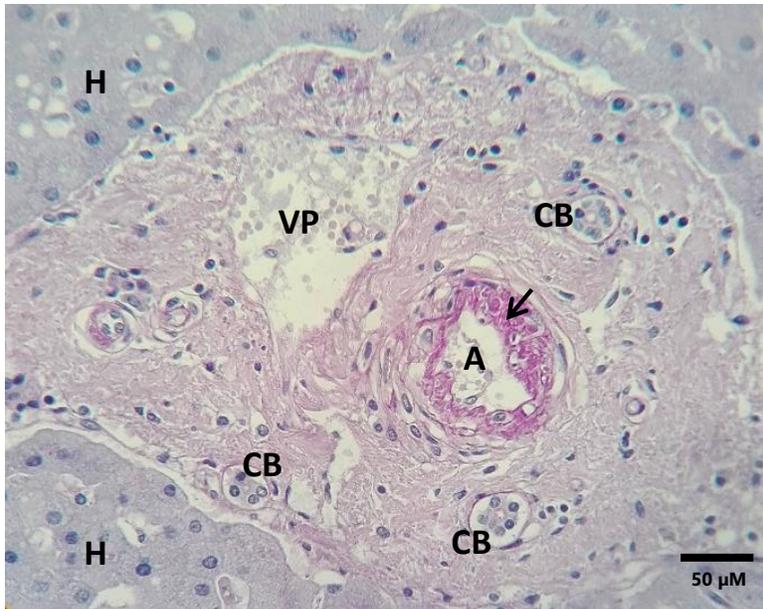


Figura 43. Hígado T1 PAS. Corte de hígado fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de una triada hepática (vena porta (VP), arteria (A) con su membrana basal (flecha) teñida en púrpura y conductos biliares (CB)) rodeado de hepatocitos (H) dispuestos en cordones. Los núcleos celulares se encuentran bien definidos por la tinción en color azul-morado (40x).

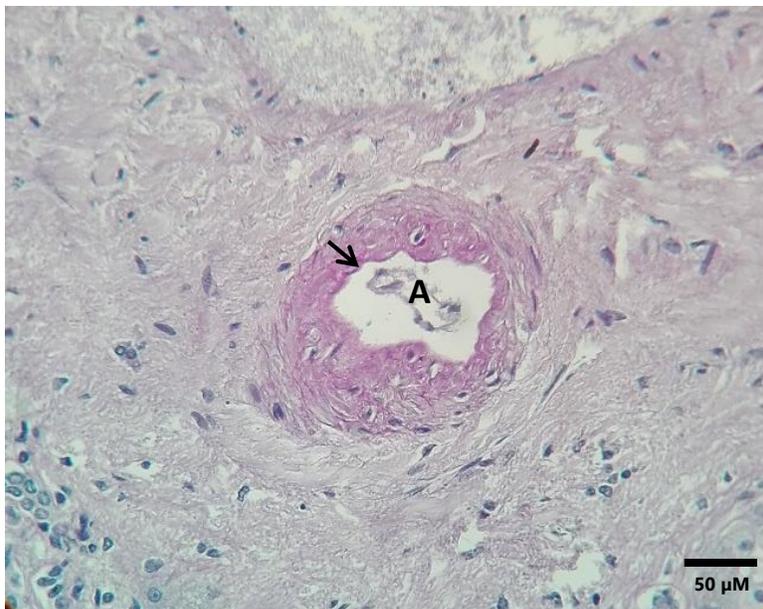


Figura 44. Hígado T2 PAS. Corte de hígado fijado con el T2 (PEG), se aprecia el detalle de una arteria (A) perteneciente a una triada con su membrana basal (flecha) teñida de púrpura. Los núcleos celulares se encuentran bien definidos por la tinción en color azul-morado (40x).

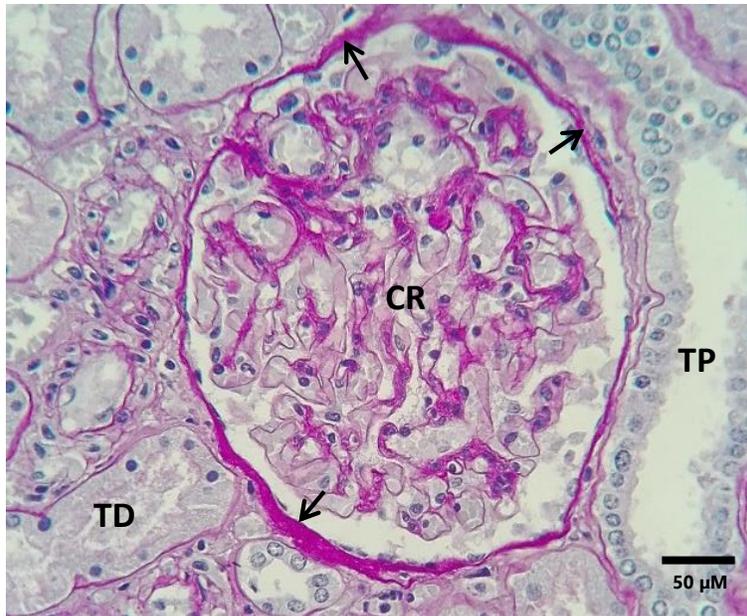


Figura 45. Riñón T1 PAS. Corte de riñón fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de un corpúsculo renal (CR) con la membrana basal de la capsula de Bowmann teñida en púrpura (flechas), túbulo contorneado proximal (TP) y distal (TD). Los núcleos celulares de los podocitos y de las células de los túbulo contorneado se encuentran bien definidos por la tinción (40x).



Figura 46. Riñón T2 PAS. Corte de riñón fijado con el T2 (PEG), se aprecia el arreglo de un corpúsculo renal (CR) con la membrana basal de la capsula de Bowmann teñida en púrpura (flechas), se perdió un poco el detalle de los túbulo contorneado proximal (TP) y distal (TD, pero sus membranas basales los definen bien. Los núcleos celulares de los podocitos y de las células de los túbulo contorneado se encuentran bien definidos por la tinción (40x).

Tinción Ziehl-Neelsen (Z-N)

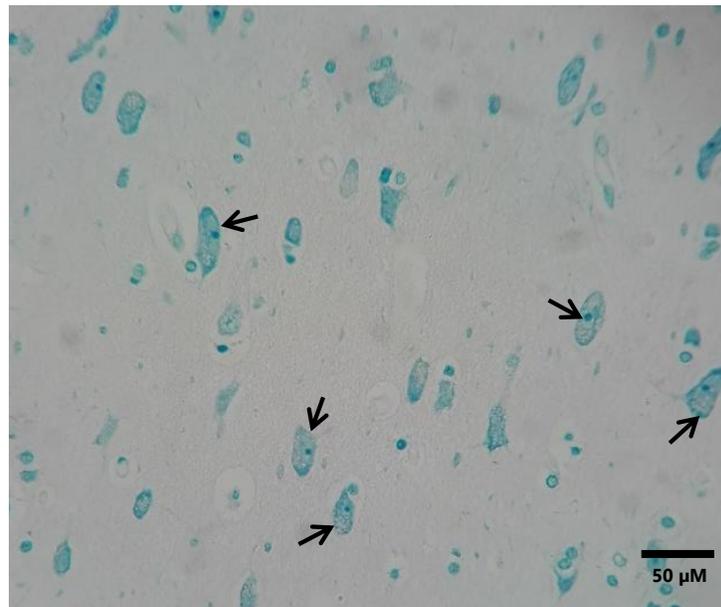


Figura 47. Encéfalo T1 ZN. Corte de encéfalo fijado con el T1 (formol), se aprecian neuronas (*flechas*) con núcleos bien definidos, pero con una gran retracción celular en todas ellas. La tinción es negativa para BAAR y bacilo de la Tuberculosis (40x).

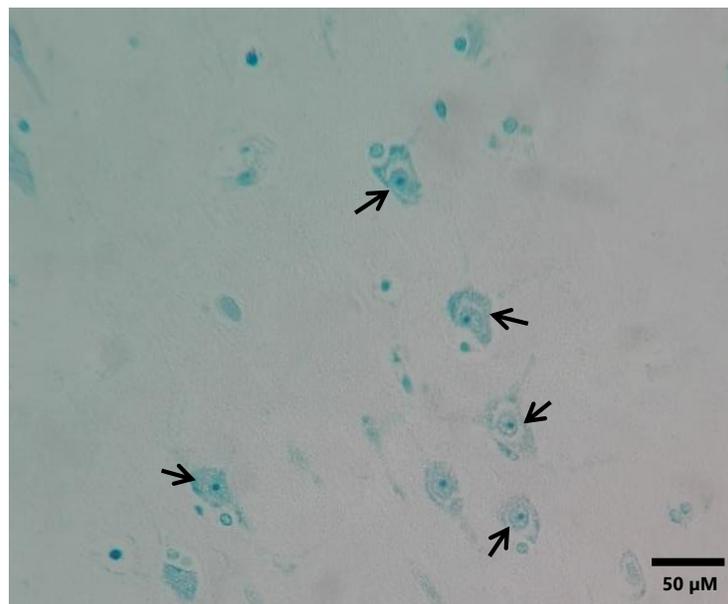


Figura 48. Encéfalo T2 ZN. Corte de encéfalo fijado con el T2 (PEG), se aprecian neuronas (*flechas*) con núcleos poco definidos. Las neuronas presentan muy poca o nula retracción celular. La tinción es negativa para BAAR y bacilo de la Tuberculosis (40x).

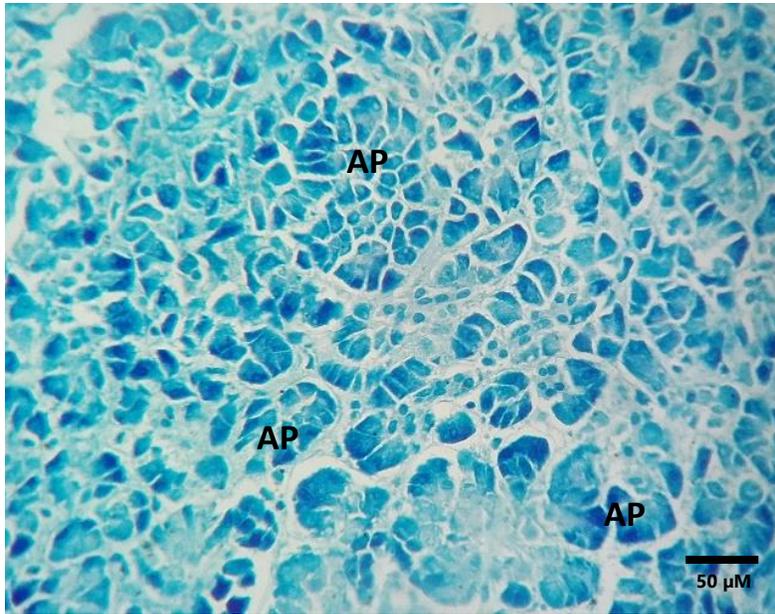


Figura 49. Páncreas T1 ZN. Corte de páncreas fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de los acinos pancreáticos (AP) teñidos en azul. La tinción es negativa para BAAR y bacilo de la Tuberculosis (40x).

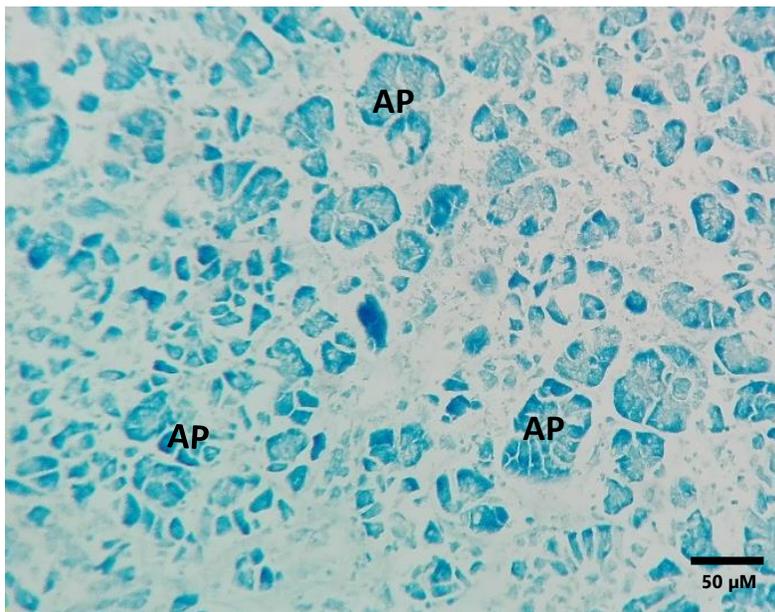


Figura 50. Páncreas T2 ZN. Corte de páncreas fijado con el T2 (PEG), se aprecia el arreglo poco definido de los acinos pancreáticos (AP) teñidos en azul. Se perdió la histología general del tejido. La tinción es negativa para BAAR y bacilo de la Tuberculosis (40x).

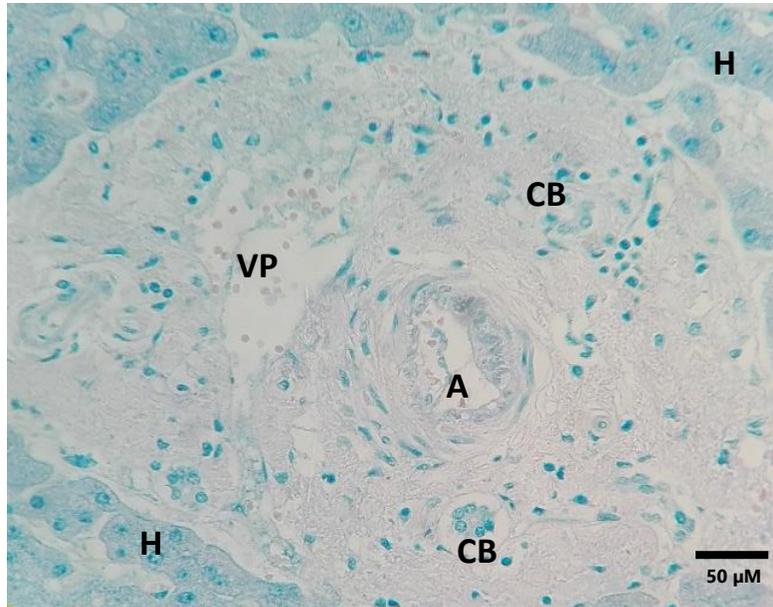


Figura 51. Hígado T1 ZN. Corte de hígado fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de una triada hepática (vena porta (VP), arteria (A) y conductos biliares (CB)) rodeado de hepatocitos (H) dispuestos en cordones. Los núcleos celulares se encuentran teñidos en color azul. La tinción es negativa para BAAR y bacilo de la Tuberculosis (40x).

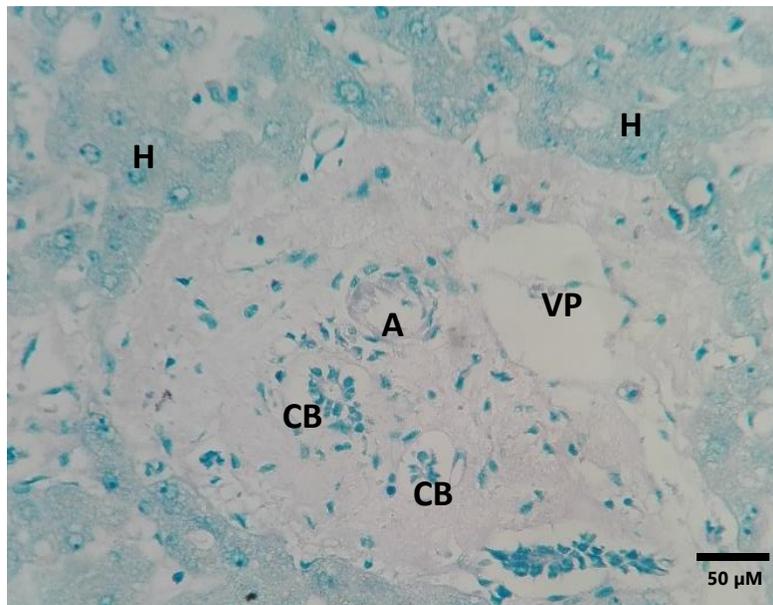


Figura 52. Hígado T2 ZN. Corte de hígado fijado con el T2 (PEG), se aprecia el arreglo de una triada hepática (vena porta (VP), arteria (A) y conductos biliares (CB)) rodeado de hepatocitos (H) dispuestos en cordones. Los núcleos celulares se encuentran teñidos en color azul. La tinción es negativa para BAAR y bacilo de la Tuberculosis (40x).

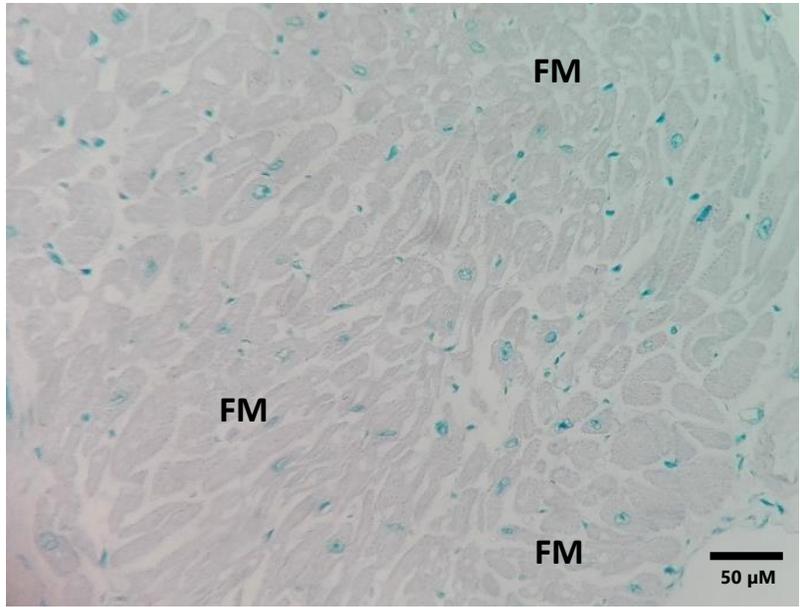


Figura 53. Corazón T1 ZN. Corte de corazón fijado con el T1 (formol), se aprecian fibras de músculo cardíaco en corte transversal (FM) sin tinción, mientras que los núcleos celulares se encuentran teñidos de azul (40x).

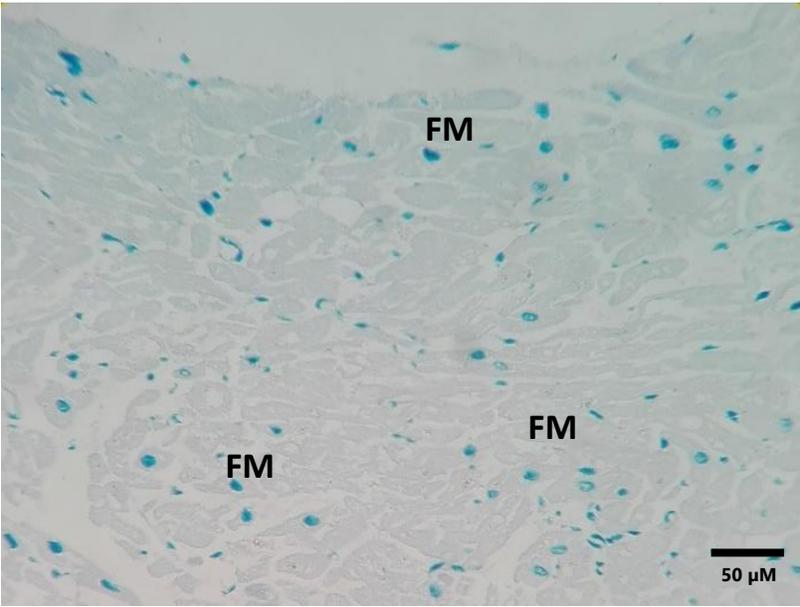


Figura 54. Corazón T2 ZN. Corte de corazón fijado con el T2 (PEG), se aprecian fibras de músculo cardíaco en corte transversal (FM) sin tinción, mientras que los núcleos celulares se encuentran teñidos de azul (40x).

Tricrómica de Masson

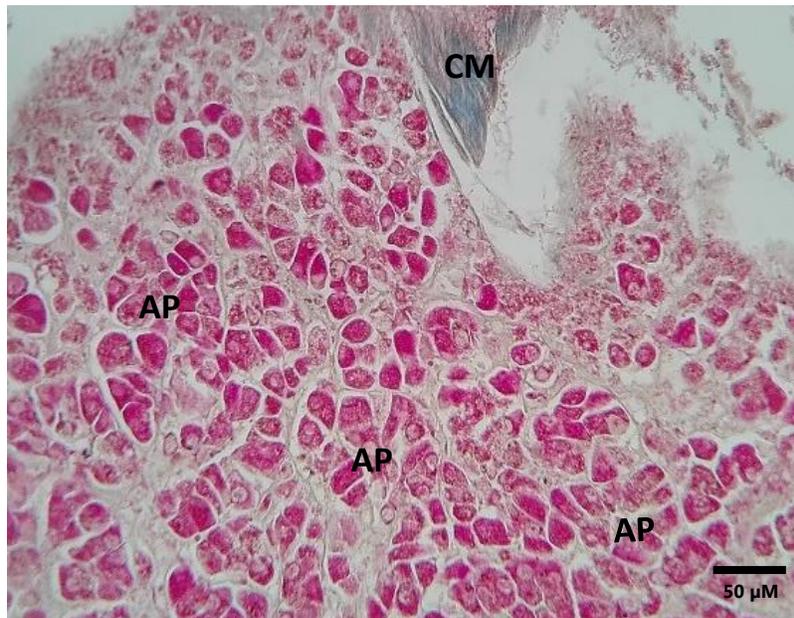


Figura 55. Páncreas T1 Masson. Corte de páncreas fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de los acinos pancreáticos (AP). En la parte derecha superior de la fotomicrografía se aprecia la colágena madura (CM) teñida en color azul (40x).

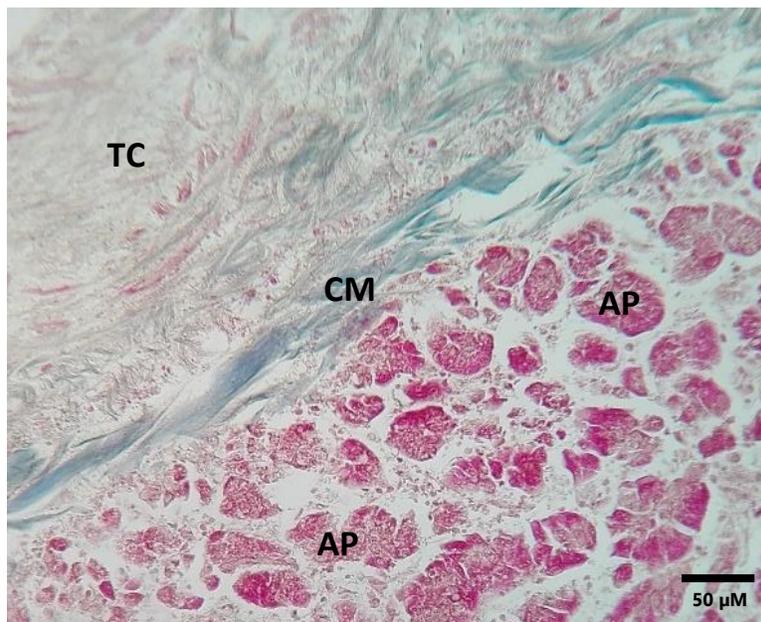


Figura 56. Páncreas T2 Masson. Corte de páncreas fijado con el T2 (PEG), el arreglo de los acinos pancreáticos (AP) se encuentra poco definido. Se aprecia la colágena madura (CM) teñida en color azul y en la parte izquierda de la fotomicrografía se observa tejido conjuntivo (TC) (40x).

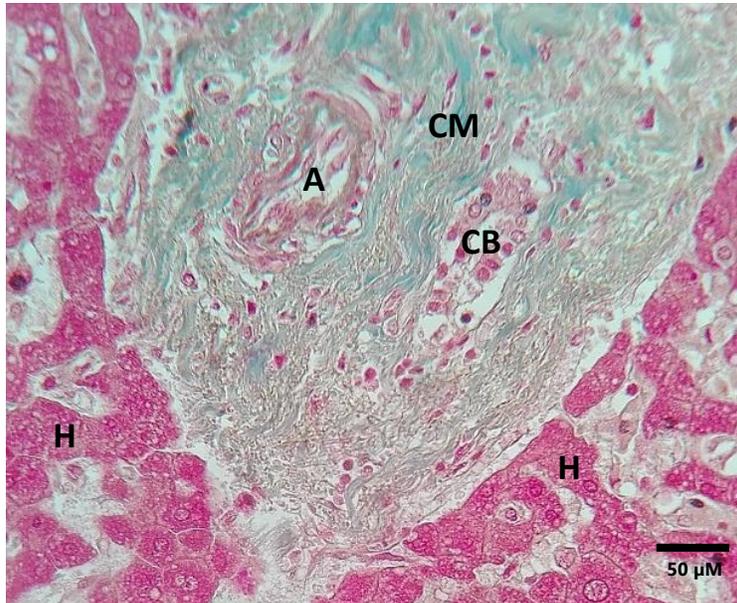


Figura 57. Hígado T1 Masson. Corte de hígado fijado con el T1 (formol), se observa el detalle de una triada hepática (arteria (A) y conducto biliar (CB)) rodeado de hepatocitos (H) dispuestos en cordones. Se destaca la colágena madura de la triada teñida en color azul-verde (CM) (40x).

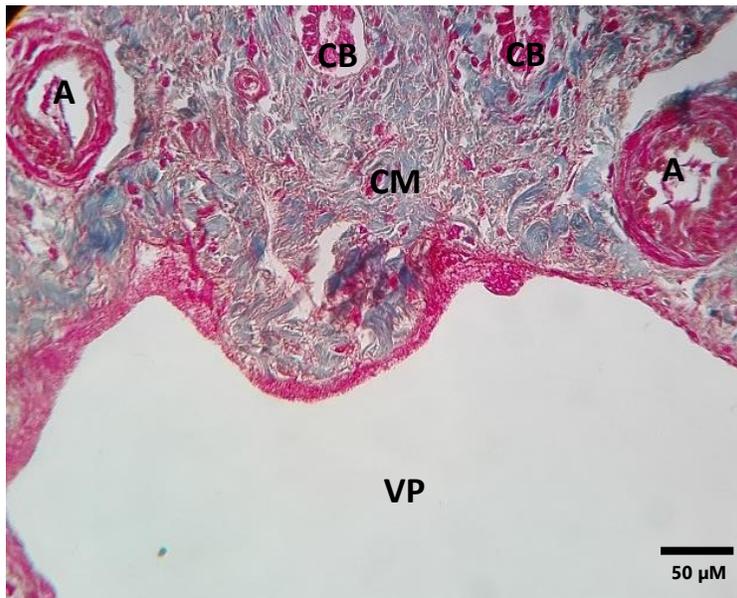


Figura 58. Hígado T2 Masson. Corte de hígado fijado con el T2 (PEG), se observa el detalle de una triada hepática (vena porta (VP), arteria (A) y conducto biliar (CB)). Se destaca la colágena madura de la triada teñida en color azul (CM) (40x).

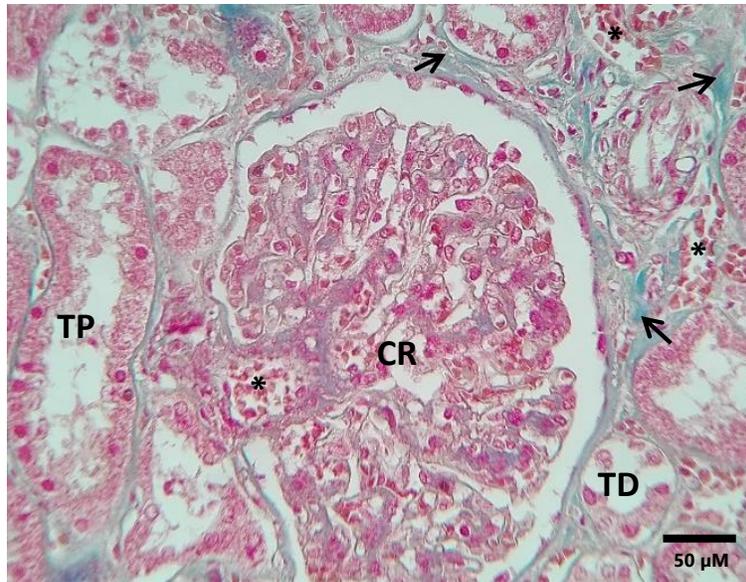


Figura 59. Riñón T1 Masson. Corte de riñón fijado con el T1 (formol), se aprecia el arreglo de un corpúsculo renal (CR) con la colágena madura que lo rodea teñida en azul-verde (*flecha*), los túbulos contorneado proximales (TP) y distales (TD) que presentan autólisis, así como vasos sanguíneos con eritrocitos (*) (40x).

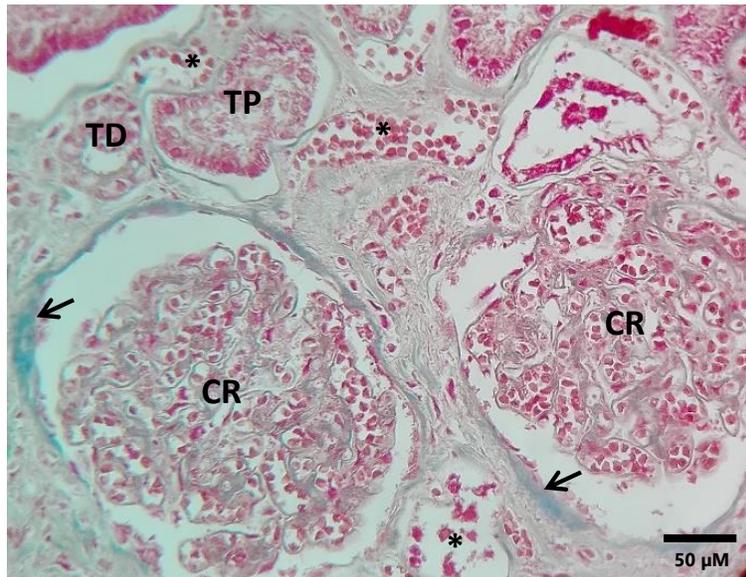


Figura 60. Riñón T2 Masson. Corte de riñón fijado con el 2 (PEG), se aprecia el arreglo de dos corpúsculos renales (CR) con la colágena madura que lo rodea teñida en azul-verde (*flecha*), túbulos contorneado proximales (TP) y distales (TD) que presentan autólisis avanzada, así como vasos sanguíneos con eritrocitos (*) (40x).



Figura 61. Corazón T1 Masson. Corte de corazón fijado con el T1 (formol), se aprecian fibras de músculo cardíaco en corte transversal (FM) teñidas de color rosa-rojo mientras que la colágena madura (CM) se encuentra teñida de azul (40x).

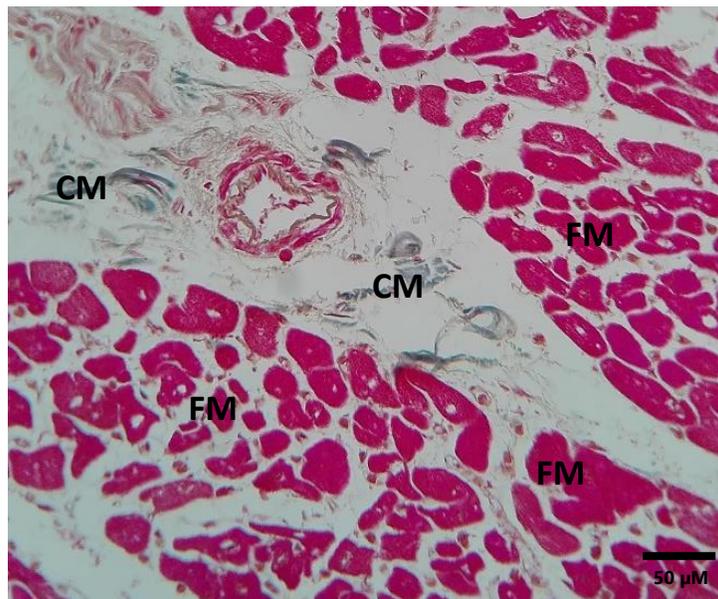


Figura 62. Corazón T2 Masson. Corte de corazón fijado con el T2 (PEG), se aprecian fibras de músculo cardíaco en corte transversal (FM) teñidas de color rosa-rojo mientras que la colágena madura (CM) se encuentra teñida de azul (40x).

Tinción Gram

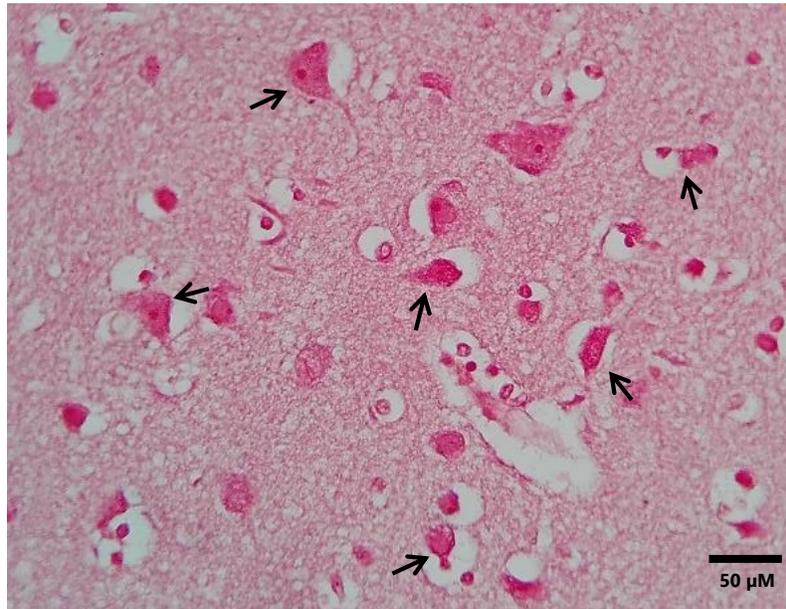


Figura 63. Encéfalo T1 Gram. Corte de encéfalo fijado con el T1 (formol), se aprecian las neuronas (**flechas**) y todo el tejido teñido con distintas tonalidades de rosa-roja y las neuronas presentan una gran retracción celular. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (**40x**).

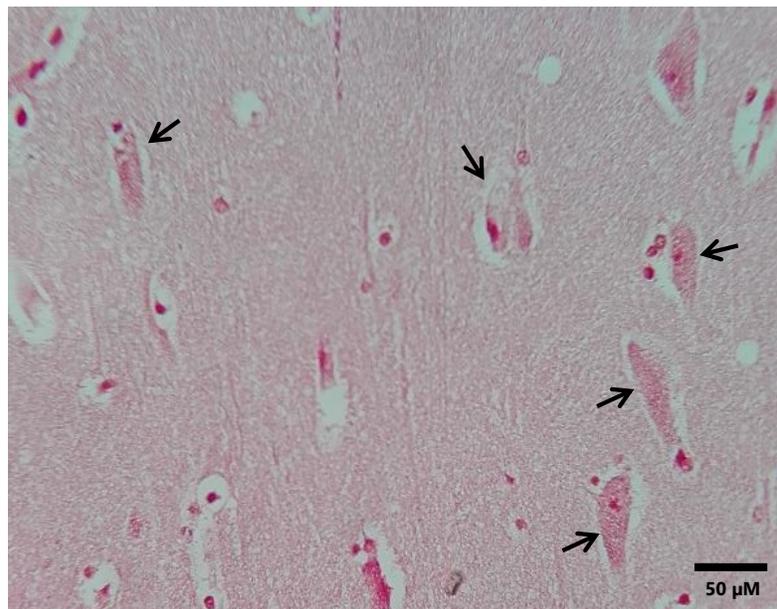


Figura 64. Encéfalo T2 Gram. Corte de encéfalo fijado con el T2 (PEG), se aprecian las neuronas (**flechas**) y todo el tejido teñido con distintas tonalidades de rosa-roja y las neuronas presentan ligera retracción celular. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (**40x**).

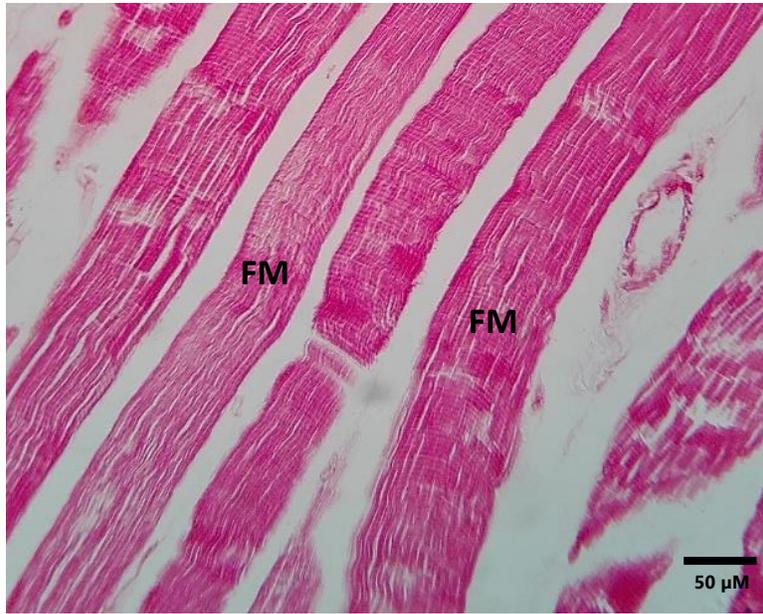


Figura 65. Músculo T1 Gram. Corte de músculo fijado con el T1 (formol), se aprecian fibras musculares (FM) en corte longitudinal teñidas de color rojo-rosa intenso. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).

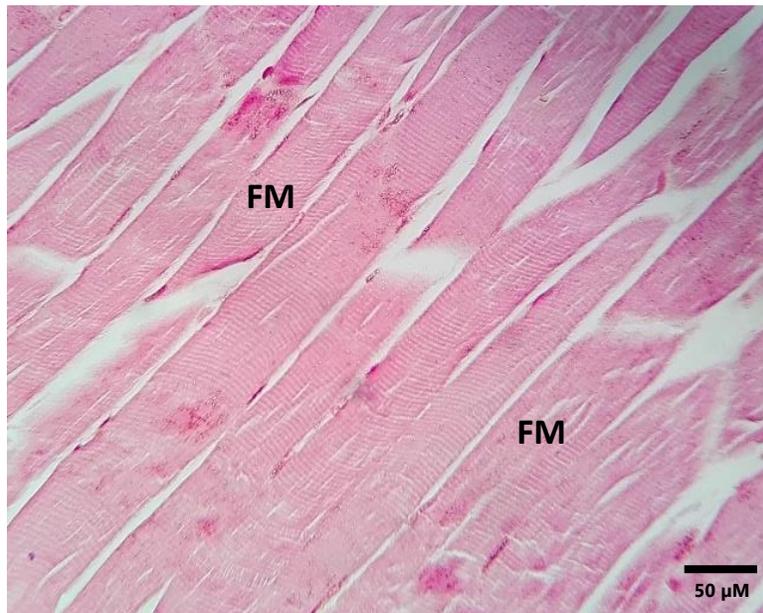


Figura 66. Músculo T2 Gram. Corte de músculo fijado con el T2 (PEG), se aprecian fibras musculares (FM) en corte longitudinal teñidas de color rojo-rosa. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).

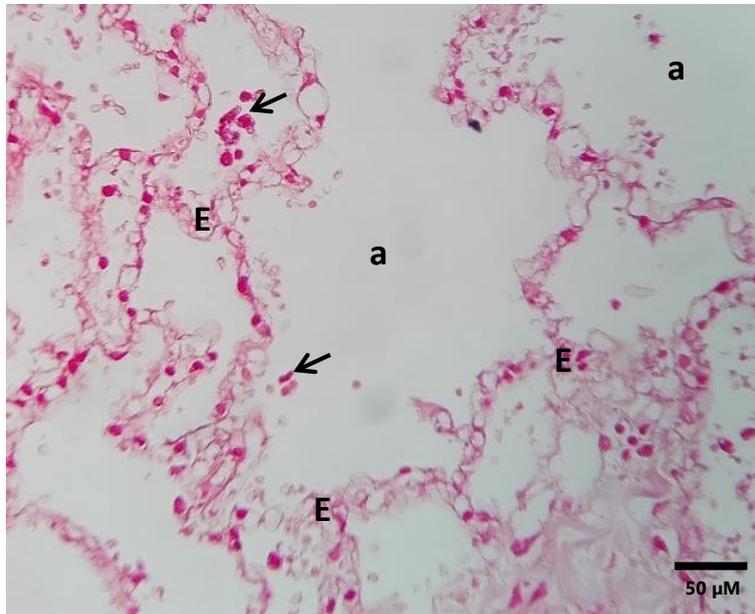


Figura 67. Pulmón T1 Gram. Corte de pulmón fijado con el T1 (formol), se aprecia el epitelio alveolar (E) formando los alveolos (a). Debido a que se trata de un pulmón con edema, se aprecian eritrocitos (flechas) en los alveolos. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).



Figura 68. Pulmón T2 Gram. Corte de pulmón fijado con el T2 (PEG), se aprecia el epitelio alveolar (E) formando los alveolos (a). Debido a que se trata de un pulmón con edema, se aprecian eritrocitos (flechas) y macrófagos (M) en los alveolos. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).

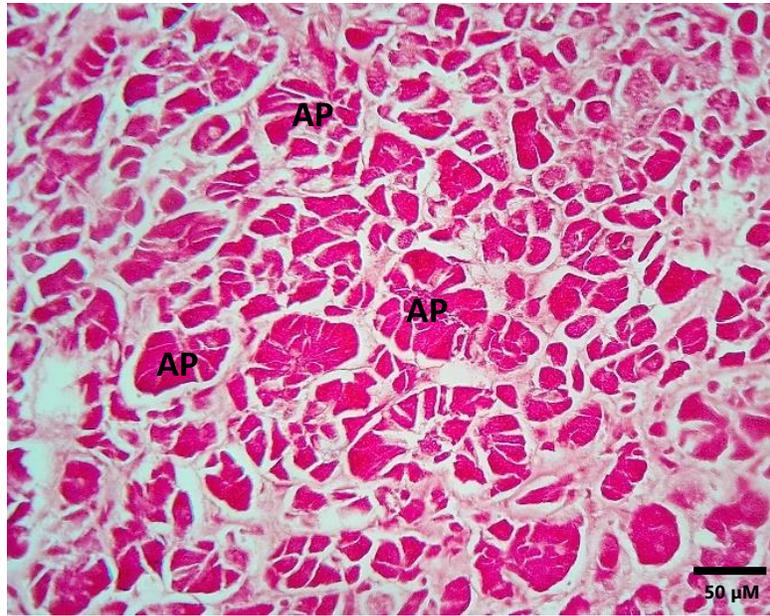


Figura 69. Páncreas T1 Gram. Corte de páncreas fijado con el T1 (formol), se aprecian los acinos pancreáticos (AP) teñidos de rojo-rosa sin el detalle nuclear. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).

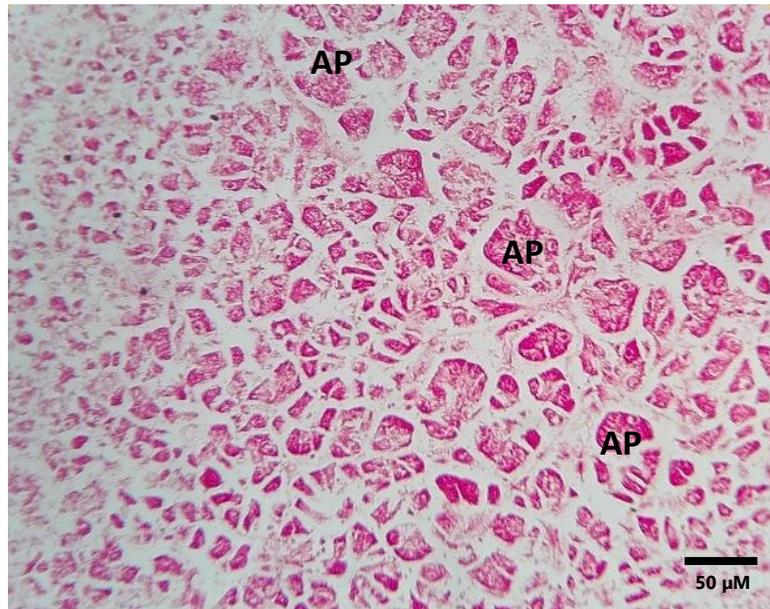


Figura 70. Páncreas T2 Gram. Corte de páncreas fijado con el T2 (PEG), se aprecian los acinos pancreáticos (AP) teñidos de rojo-rosa sin el detalle nuclear y con cierto grado de autólisis. La tinción es negativa para bacterias tanto gram positivas como negativas (40x).

ANEXO II. PERFILES GENÉTICOS DE REFERENCIA

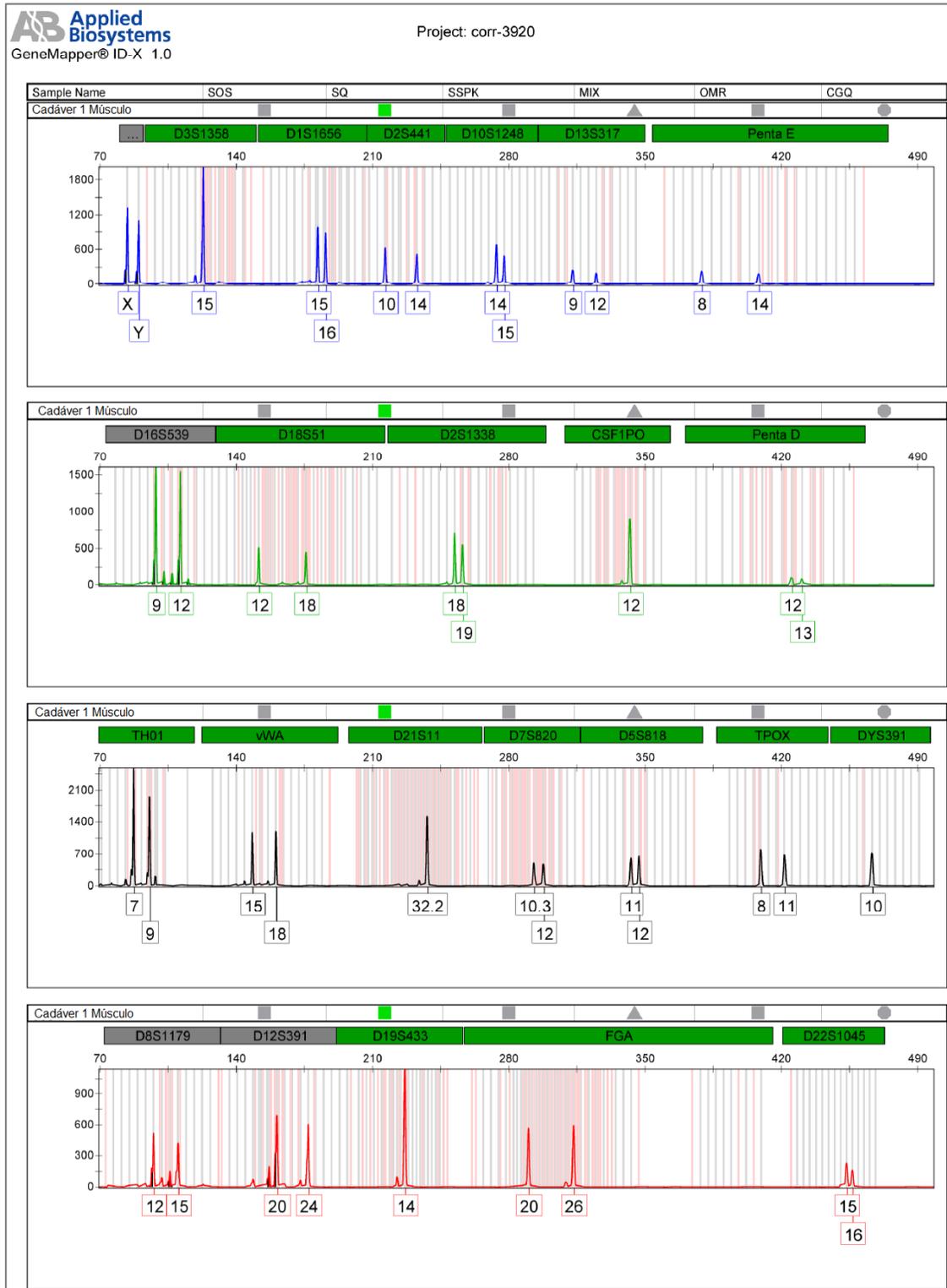


Figura 71. Perfil genético cadáver 1. Se muestra el perfil genético del cadáver 2 obtenido a partir de tejido muscular en fresco.

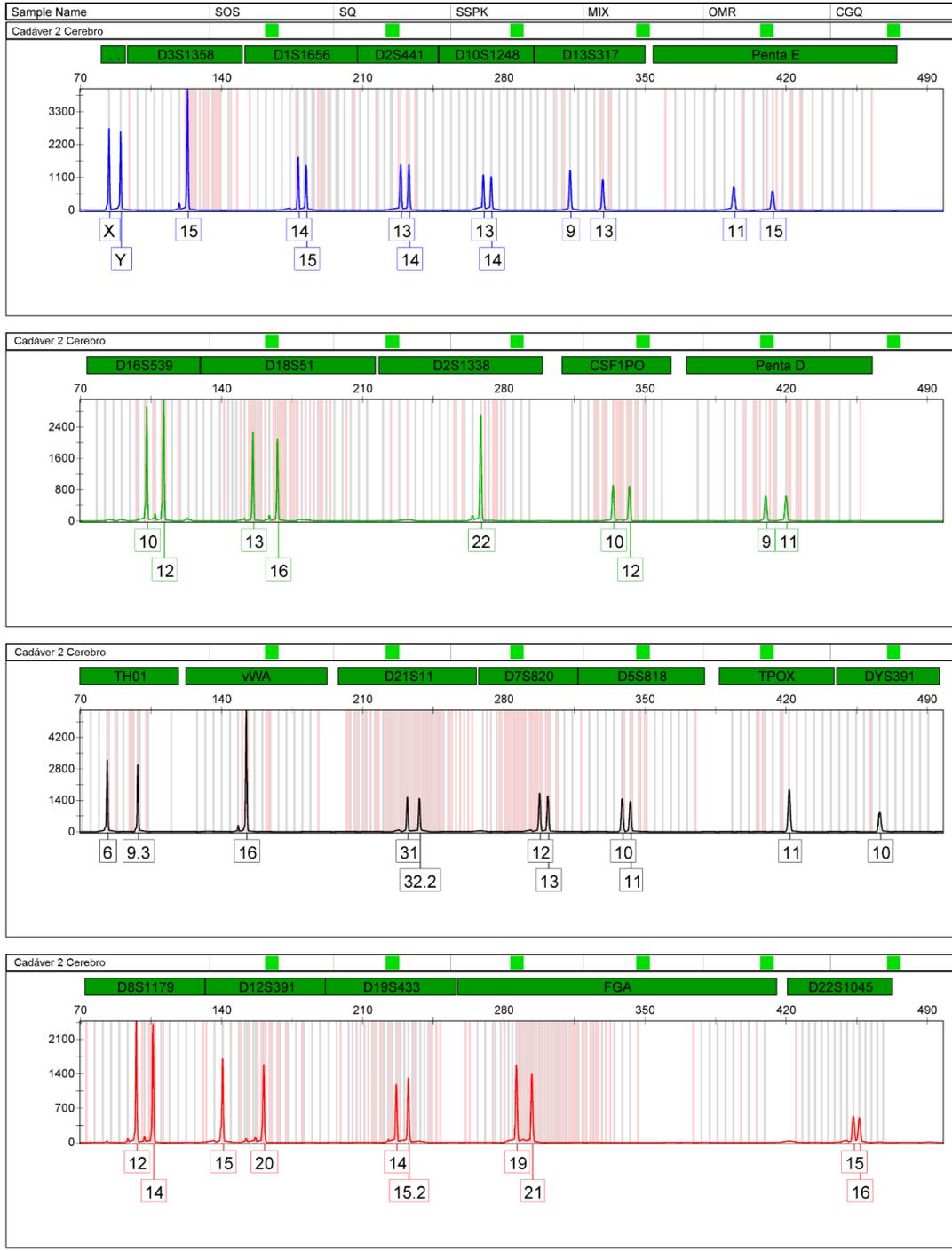


Figura 72. Perfil genético cadáver 2. Se muestra el perfil genético del cadáver 2 obtenido a partir de tejido cerebral en fresco.

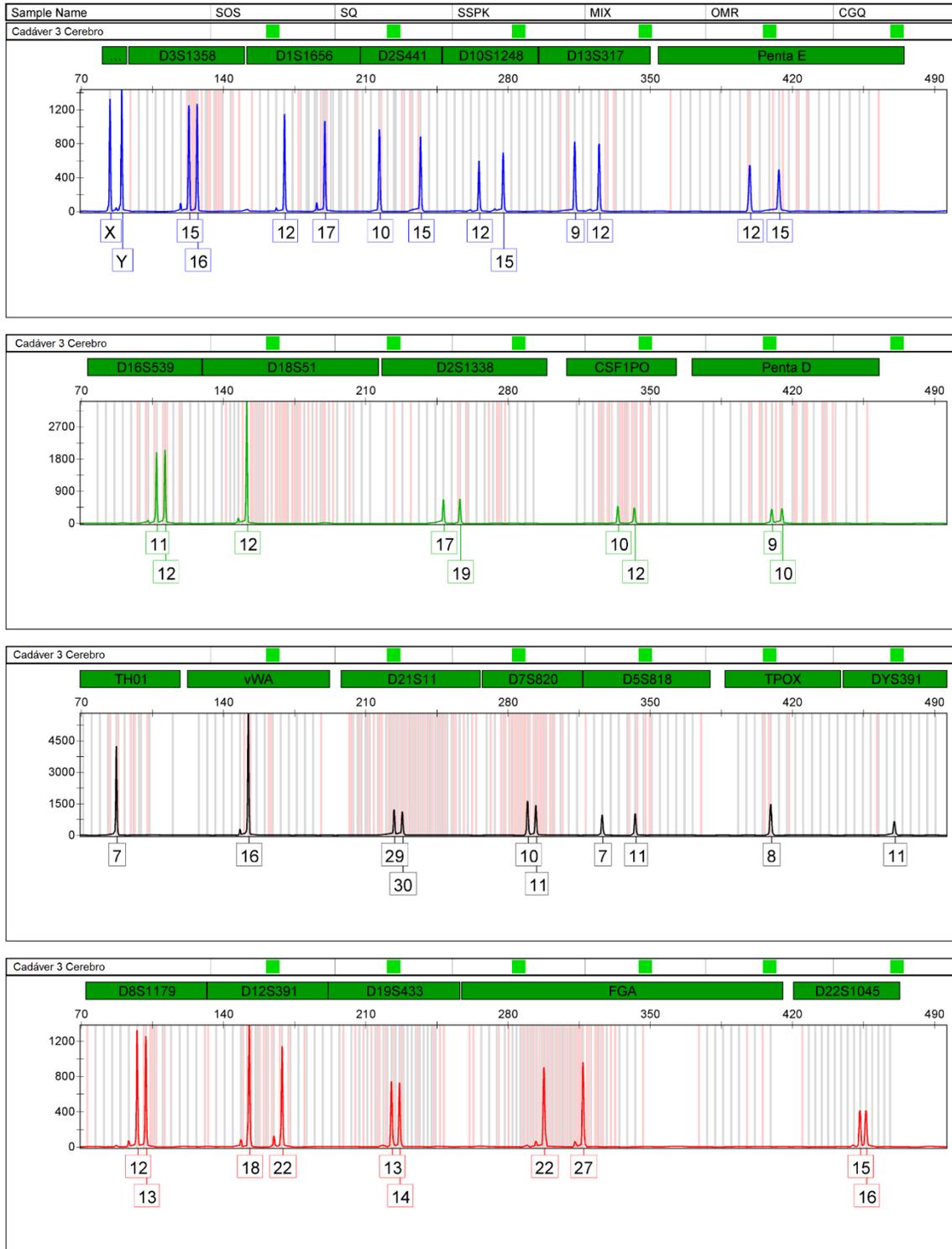


Figura 73. Perfil genético cadáver 3. Se muestra el perfil genético del cadáver 3 obtenido a partir de tejido cerebral en fresco.

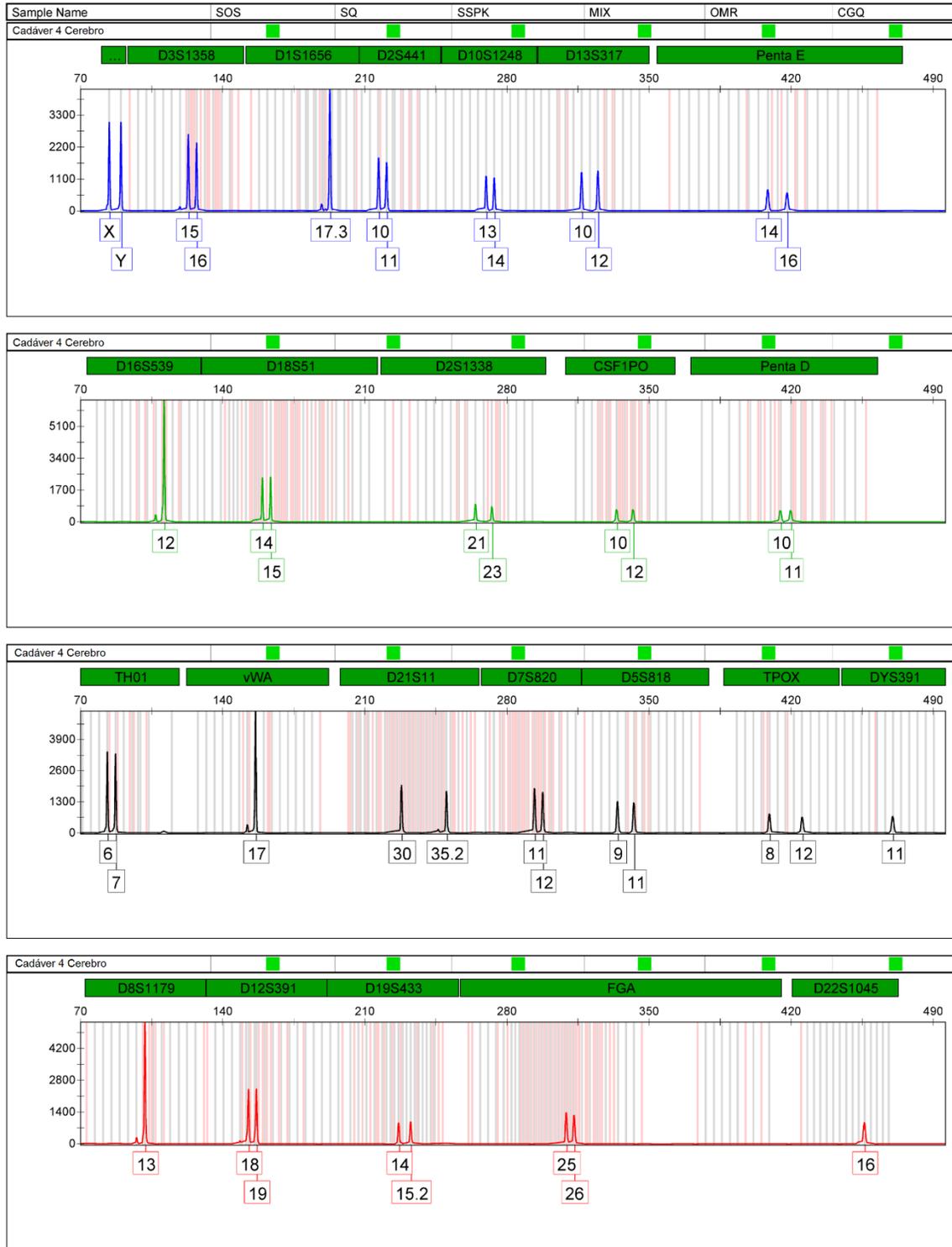


Figura 74. Perfil genético cadáver 4. Se muestra el perfil genético del cadáver 4 obtenido a partir de tejido cerebral en fresco.

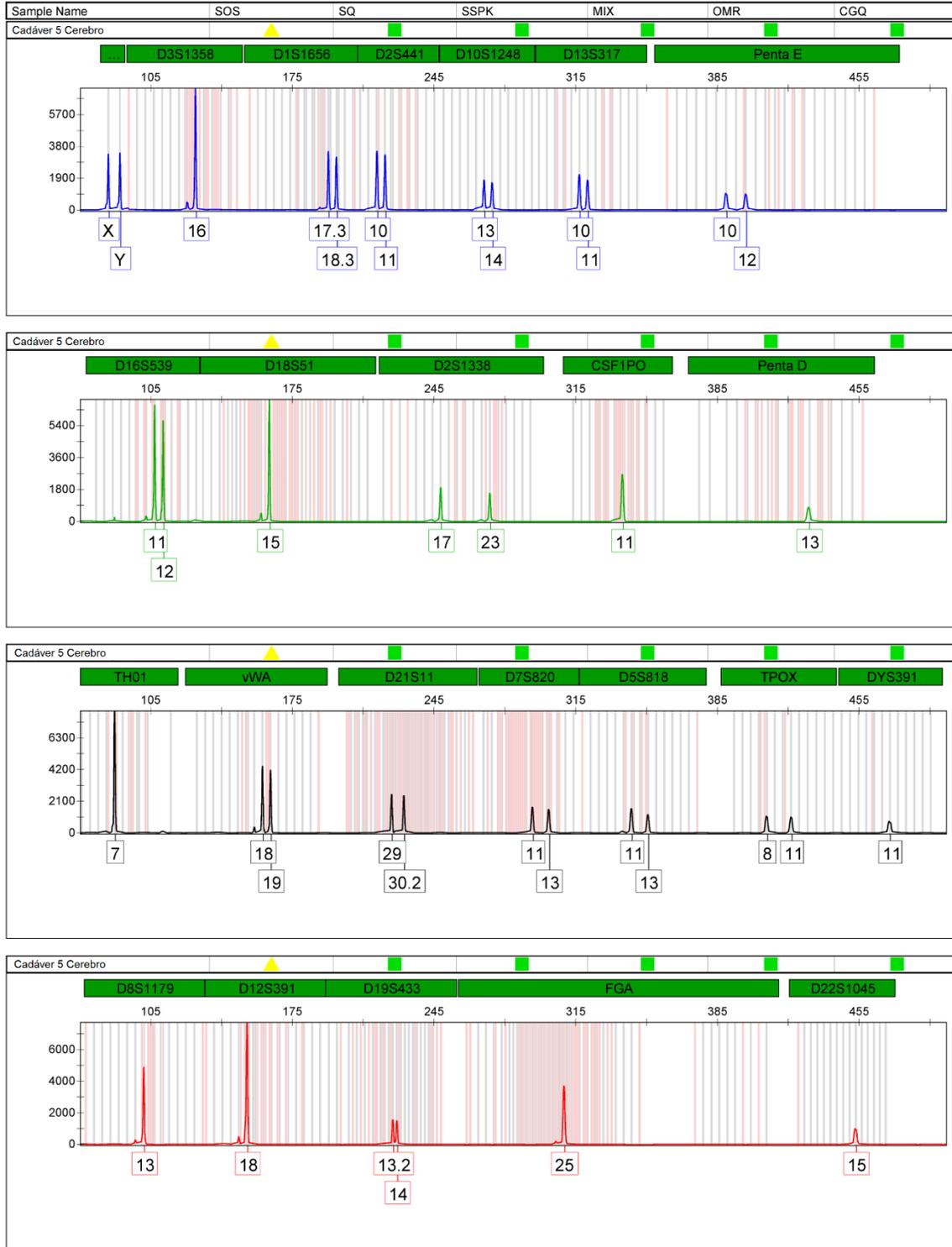


Figura 75. Perfil genético cadáver 5. Se muestra el perfil genético del cadáver 5 obtenido a partir de tejido cerebral en fresco.