

33
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE REACCION EN CADENA
DE LA POLIMERASA (RCP) PARA LA DETERMINACION ALELICA
DEL LOCUS AaBb DEL CROMOSOMA HUMANO No. 9 Y LA
EVALUACION DE SU APLICABILIDAD EN EL AREA FORENSE CON
FINES IDENTIFICATIVOS."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
JUAREZ CEDILLO TERESA



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

ASESORES:
M. en C. ALFONSO LUNA VASQUEZ
Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE

MEXICO, D. F.

JULIO 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264071



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.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL
LABORATORIO DE "GENÉTICA FORENSE" DE
LA DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS
PERICIALES DE LA PROCURADURÍA
GENERAL DE JUSTICIA DEL DISTRITO
FEDERAL.**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**M. en C. ALFONSO LUNA VÁSQUEZ.
Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE.**

JURADO:

PRESIDENTE: *M. en C. ALFONSO LUNA VÁSQUEZ.*

VOCAL: *Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE.*

SECRETARIO: *M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA*

SUPLENTE: *Q.F.B. ROBERTO GONZÁLEZ MELENDEZ*

SUPLENTE: *Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA.*

AGRADECIMIENTOS

*Mi más inmenso agradecimiento a Dios
por permitirme alcanzar una de mis más
importantes metas y por dejarme compartirla
con mis seres queridos.*

A MIS PADRES:

Aurora Cedillo Ayala.

Valente Juárez Mendoza.

*Por su inmenso cariño y confianza
depositada en mi durante toda mi vida, por
permitirme tomar mis propias decisiones,
guiarme con sabiduría, paciencia y ser el más
grande aliciente en mi superación personal.*

A MIS HERMANOS:

Judith, Enrique, Martha, Esther y Jorge.

*Por que siempre me alentaron y dieron su
apoyo incondicional para la culminación de
mi mayor logro.*

A JORGE.

*Por mostrarme su cariño compartiendo
conmigo los momentos más difíciles
alentándome con su optimismo a concluir el
camino trazado.*

A MIS AMIGOS.

*Por impulsarme con su amista a crecer como
ser humano.*

A MIS ASESORES:

M. en C. Alfonso Luna Vásquez.

Q.F.B. Lourdes Vega Navarrete.

Por permitir que me integrara a su equipo de trabajo y compartir conmigo de la manera más humilde sus conocimientos.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE.

Alfonso, Arturo, Elena, Gaby, Gloria,

Lourdes, Manuel, Maru, Marco, Raúl, Rayo y Violeta.

Por la paciencia y ayuda recibida durante la realización de este trabajo.

A MIS SINODALES:

Por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

A MIS PROFESORES:

Por darme las bases que solidifican mi carrera profesional.

AGRADEZCO DE MANERA MUY ESPECIAL A:

LiC. Manuel M. Castro Ojeda.

Por la confianza, amistad y apoyo incondicional, mostrado durante la realización de este trabajo.

Q.F.B. Roberto, González Melendez.

Por su amistad sincera y su firme intención de apoyarme en la culminación de mi meta.

*Q.F.B. Gabriela Saavedra Cortes.
Por su paciencia y por transmitirme de manera
desinteresada sus conocimientos.*

*Q.F.B. Elena S. Avarca Ávila.
Por su amistad y compañía durante el tiempo
que duro la parte experimental del presente
trabajo.*

*Dr. Eduardo González Mata.
Por brindarme la oportunidad de desarrollar
los conocimientos adquiridos en la
institución que tan dignamente dirigió.*

*Y a todos a quienes de una u otra forma contribuyeron a la
realización de mi más grande sueño.*

MIL GRACIAS.

INDICE

RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	5
ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS MARCADORES GENÉTICOS FORENSES.	9
SELECCIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS FORENSES	13
ASPECTOS FORENSES DEL ANÁLISIS DE LOS MARCADORES GENÉTICOS.	14
ASPECTOS HISTÓRICOS DEL SISTEMA ABO.	15
GENÉTICA DEL GRUPOS SANGUÍNEO ABO.	17
DESARROLLO DE LOS ANTÍGENOS A Y B.	19
ACTIVIDADES BIOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE LOS ANTÍGENOS A, B Y H .	19

DIAGRAMA DE FLUJO. . .XX60

DISEÑO ESTADÍSTICO. . .XX61

RESULTADOS. . .XX64

DISCUSIÓN DE RESULTADOS. . .XX76

CONCLUSIONES. . .XX81

BIBLIOGRAFÍA. . .XX84

APÉNDICE A. . .XX89

APÉNDICE B. . .XX90

APÉNDICE C. . .XX95

APÉNDICE D. . .XX97

GLOSARIO. . .XX99

RESUMEN

Las instituciones encargadas de la administración de justicia, se caracterizan por los rápidos y profundos cambios en las metodologías aplicadas para la resolución de un hecho delictivo con una gran dependencia respecto a los desarrollos tecnológicos, por lo que estas instituciones tienen una constante y creciente necesidad de apoyo por parte de la ciencia y la tecnología.

El objetivo fundamental de los laboratorios forenses es examinar los indicios con el fin de obtener toda la información que ayude a solucionar las interrogantes sobre un hecho o acto criminal, así como la relación de parentesco que exista entre un individuo y otro, fundamentando veraz y eficazmente los resultados que se obtengan.

Los resultados del proceso de cambio social que se ha verificado en los últimos años han sido todos y cada uno de los elementos que dan origen a un nuevo sistema de identificación, el cual se basa en el análisis directo del material genético ácido desoxirribonucleico (ADN), mediante la utilización de técnicas como el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (PLFR) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

No pudiéndose escapar el sistema de grupo sanguíneo ABO se decidió realizar este estudio prospectivo, transversal y descriptivo, que permitió estandarizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la determinación de las formas alélicas del locus ABO, toda vez que entre los indicios que frecuentemente se producen durante la comisión de diversos delitos, las manchas de sangre ocupan un lugar predominante, de ahí la importancia de efectuar sobre esta evidencia física un estudio eficiente, que sea de verdadera utilidad para el esclarecimiento de los hechos que se investigan.

El AND se obtuvo mediante extracción no orgánica y para su amplificación por medio de la PCR se utilizaron "oligos" específicos para este locus identificando los alelos presentes en la muestra mediante la observación visual de las bandas presente en un gel de poliacrilamida comparándolas con el marcador de peso molecular de 100pb.

Evalutando diferentes concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla de PCR se logro la optimizacion de la reacción, permitió conocer tanto el fenotipo como el genotipo de la muestras en estudio, es decir el par de alelos que heredo de los padres, incluyendo las seis posibles combinaciones A/A, B/B, A/B, A/O, B/O, O/O, no solamente de muestras sanguíneas sino también a partir de virtualmente todos los especímenes biológicos de los cuales se pueda extraer ADN

La cantidad mínima de ADN que se requiere para obtener resultados confiables es de 2ng por muestra en un volumen final de 60µl. Lo que la hace sumamente útil para la tipificación de muestras forenses donde frecuentemente la cantidad de material encontrado como evidencia disponible para el análisis es muy pequeña e irremplazable.

Posteriormente se analizaron 210 muestras provenientes de personas voluntarias (visitantes) y de aquellas personas relacionadas con alguna de las averiguaciones previas, sin parentesco familiar y que nacieron y/o radican en el D.F. o en la zona metropolitana de la ciudad de México.

A cada muestra se le determinó el fenotipo sanguíneo ABO por medio de reacciones serológicas “ prueba serológica en lamina” utilizando los antisueros comerciales Anti -A y Anti-B

Tomando como referencia la técnica serológico para la determinación de grupo sanguíneo ABO, se encontraron que la confiabilidad para la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la determinación de grupo sanguíneo del sistema ABO en cualquier tipo de muestra biológica fue del 99.8%.

Como era de esperarse el grupo sanguíneo de mayor incidencia en la población analizada fué el grupo “O” sin embargo, gracias al análisis por la técnica de PCR el poder de discriminación encontrado se incremento en un 43% con respecto al reportado para la técnica serológica.

Para concluir, puede decirse que se trata de definir y valorar los puntos medulares del sistema de identificación por ADN para el sistema de grupo sanguíneo ABO, no para poner de manifiesto los que ya existen si no para demostrar que su aplicación es factible en el área de la identificación. Así con la interpretación de esta técnica se contará con un marcador genético más para poder hacer un análisis discriminativo en caso de violación, homicidio, así como para excluir o no excluir a una persona como padre, madre o hijo biológico, o para poder llevar a cabo la identificación de cadáveres con mayor seguridad y exactitud basadas en la información genética presente en cada uno de los individuos en cuestión.

INTRODUCCIÓN

La identificación es una necesidad social que se remonta a los primeros siglos de la humanidad, y día a día se hace más indispensable, sobre todo en el cambiante mundo en el que vivimos, lo cual nos ha obligado a buscar la manera más adecuada para lograr la identificación.

Entre las Ciencias Forenses; que son muchas y muy diversas se encuentra la criminalística donde se aplican los sistemas de identificación tales como la antropometría física, el retrato hablado, la dactiloscopia (situada en la sociedad desde su descubrimiento como el símbolo único y permanente para diferenciar a una persona de otra), etc.; mismas que han servido a través de la historia para la identificación de personas vivas, muertas o de hallazgos corporales, contando con la intervención de las correspondientes instituciones de investigación, impartición y procuración de justicia, para corroborar o en su caso determinar con gran certeza mediante un detallado análisis de las evidencias físicas y biológicas obtenidas, la identidad de un ser humano.

Una herramienta importante de la criminalística son los Laboratorios Forenses, los cuales utilizan un número incalculable de métodos constituidos por técnicas biológicas, inmunológicas, bioquímicas, químicas, matemáticas, microscópicas y físicas; que pueden ser instrumentales, ordinarias y/o extraordinarias.

Uno de los primeros investigadores que trató de resolver el problema de identificación a través de fluidos biológicos fue Karl Landsteiner, quien clasificó a la sangre en base a reacciones inmunológicas en cuatro grupos sanguíneos A, B, AB, y O dependiendo del antígeno presente en el eritrocito.

Con el descubrimiento de la estructura del material genético, se inicia el nacimiento de la biología molecular (la cual introduce la era del ácido desoxirribonucleico ADN en la criminalística a mediados de los 80's) y con ello una etapa en la historia de la biología, motivo que da lugar a la creación de la Genética Forense, la cual es el área especializada en trabajar con diversos tipos de muestras biológicas con la finalidad de que aporten datos valiosos, certeros y confiables en el proceso de la cuantificación y confronta de muestras biológicas, la cual utiliza diversas técnicas para llegar a sus resultados.

La genética forense trabaja básicamente con la tecnología del ADN (el cual puede ser extraído virtualmente de todas las formas biológicas de evidencias) definida como DNA fingerprinting (Huella Genética), utilizada para lograr la identificación inequívoca de personas independientemente del estado en el que se encuentren; vivas, muertas, parcialmente quemadas, ahogadas, putrefactas, y descarnadas.

Esta tecnología permitió incrementar el número de marcadores genéticos factibles de ser estudiados en una muestra biológica con la finalidad de obtener la máxima información que permita lograr con éxito el propósito de identificación.

Los esfuerzos iniciales dentro de la comunidad forense para desarrollar la tipificación de ADN se basaron en el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Poco después de la introducción del análisis de RFLP se introdujo el sistema de tipificación basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el análisis de muestras forenses (1)

Tal es el caso de la secuencia polimórfica del sistema ABO la cual permite desarrollar un método para identificar los tipos sanguíneos ABO usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Simplificando aun más esta forma de identificar los tipos sanguíneos ABO a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se hace necesario el uso de oligonucleotidos específicos, para amplificar el sitio específico correspondiente a los alelos A, B u O, permitiendo identificar de esta manera mediante una visualización directa en gel de agarosa seis posibles genotipos AB, AA, BB, AO, BO, y OO. Con esto se contara un marcador más que aunado a los ya existentes nos permita individualizar con mayor confiabilidad cualquier tipo de evidencia biológica .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Identificar al autor de un acto delictuoso como un asalto de tipo sexual o un homicidio, es importante para así poder determinar el castigo correspondiente. Es por esto que todas las evidencias encontradas en el lugar de los hechos son importantes y deben seguir un determinado proceso de análisis a fin de excluir ó no excluir a un sospechoso como responsable del crimen en cuestión. Así, cuando el ministerio publico envía la evidencia (sangre, semen, cabello, etc.) al laboratorio de genética forense se le aplica un proceso de análisis iniciando con pruebas de orientación (que por lo general son reacciones con desarrollo de color) a fin de determinar la naturaleza de las muestras enviadas, si los resultados de las pruebas presuntivas son positivos para el tipo de evidencia enviada, se procede a realizar pruebas confirmatorias que validen los resultados anteriores y que corroboren que la muestra enviada es en realidad el tipo de fluido o evidencia de la que se sospecha. En seguida, se aplican las pruebas de identificación, entre las que se encuentra la determinación de anticuerpos secretores y/o la determinación de grupo sanguíneo ABO por medio de técnicas que involucran reacciones serológicas, sin embargo, para el área forense estas técnicas presentan una serie de inconvenientes, por ejemplo en el caso de las secreciones (saliva, semen), no todos los individuos presentan los antígenos correspondientes a su tipo sanguíneo (sólo aproximadamente el 80 % de la población secreta dichos antígenos en sus fluidos corporales); además, no siempre se cuenta con la cantidad y calidad de las muestras para poder realizar pruebas serológicas, e incluso en algunas ocasiones sólo se cuenta con tejidos, huesos, ó cabello, en las cuales no es posible realizar la determinación serológica de los tipos sanguíneos, surgiendo así la necesidad de implementar una técnica que permita determinar el tipo sanguíneo ABO a partir de prácticamente cualquier tipo de muestra biológica. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite lograr esto, valiéndose de la amplificación específica del gen que codifica para el sistema sanguíneo ABO, conociéndose de esta manera no sólo el fenotipo sino también el genotipo ABO que posea un individuo determinado, es por esto indispensable estandarizar la técnica para la determinación genotípica de los grupos sanguíneos del sistema ABO y analizar su confiabilidad para aplicarla en el área forense en comparación con la técnica serológica en los procesos de identificación con el fin de que este marcador se anexe a los ya existentes en el Laboratorio de Genética Forense de la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal. De esta forma se presentará la ventaja de que no sólo se contará con una prueba de identificación confiable y rápida, si no que además se contará con un sistema de identificación de un marcador genético más en el laboratorio, que aunado a los que ya existen (HLA-DQA₁, PM, D1S80) incrementarán el poder de discriminación de sospechosos en casos criminales y en los problemas de paternidad.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL ADN.

En 1950 se sabía ya que el ácido desoxirribonucleico (ADN) era una macromolécula compuesta de cuatro tipos de desoxinucleótidos: desoxiadenilato (A), desoxitimidilato (T), desoxiguanilato (G) y desoxicitidilato (C) (2,3).

En 1953 se dilucida la estructura del ADN, observándose que en la naturaleza el ADN generalmente se encuentra formado por dos hebras apareadas, las cuales poseen secuencias complementarias, el apareamiento de las bases con que contribuyen las dos hebras es tal, que sólo encajan en la estructura determinados pares de bases que pueden ligarse entre sí por enlaces de hidrógeno. Los pares permisibles son A-T y G-C, que son precisamente los pares de bases que muestran equivalencia en el ADN. El modo de como se forman los puentes de hidrógeno se muestra en la figura 1 (4,5).

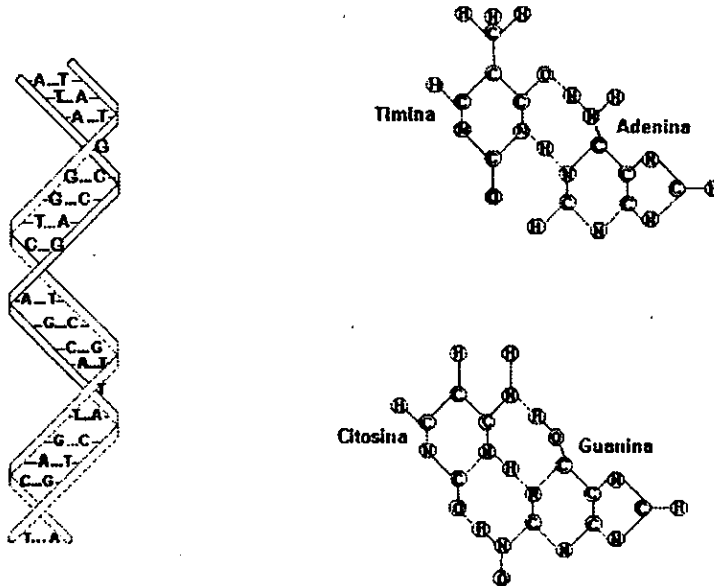


Figura1: Las hebras complementarias del ADN y dibujos a escala de los pares de bases adenina-timina y guanina-citosina, unidos por puentes de hidrógeno, el primero tiene dos enlaces de hidrógeno y el segundo presenta tres, Los pares de guanina-citosina están más próximos entre sí, son más compactos y, por tanto, más densos que los pares de adenina-timina (J. R. Pellon 1988).

Dentro de la célula, la hélice de ADN se encuentra rodeada y enrollada por proteínas llamadas histonas y no histonas. Con el aislamiento del ADN quedó comprobado que según el organismo, el ADN tiene diferentes proporciones de las bases nitrogenadas y que es la secuencia de estas bases la que codifica la información genética, en tanto que los grupos de azúcar y fosfato poseen un papel estructural (6,7)

Para 1955 Arthur Kornberg de la Universidad de Stanford y su personal asociado, descubrieron la polimerasa del ADN, enzima que presenta diversas funciones naturales entre las que se incluye la replicación del ADN (2).

En 1970 se descubrieron unas enzimas que son capaces de fragmentar el ADN en lugares específicos a las que se les llamó endonucleasas de restricción. Estas enzimas permiten cortar el ADN en fragmentos más pequeños y fáciles de identificar (2).

Esto descubrimientos permitieron que los investigadores desarrollaran técnicas para el análisis del ADN humano, uno de estos procedimientos llamado Polimorfismos de Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLP) utilizaba las enzimas de restricción las cuales eran empleadas para dividir el ADN en varios fragmentos los cuales podían separarse entre sí por electroforesis, sin embargo este procedimiento además de ser complicado era extenso y tedioso, y no resulto funcional para muestras de ADN degradado o desnaturalizado.

Otra técnica empleada es la clonación, pero también presenta el inconveniente de ser muy larga y lenta para el análisis rutinario del ADN. La secuencia de interés del ADN humano puede clonarse, o copiarse en un pequeño anillo de ADN conocido como plásmido, por medio de una bacteria se pueden producir copias del plásmido y la secuencia deseada.

A finales de los 70's, los biólogos moleculares se ocupaban en estudiar el ADN por medio de las endonucleasas y la ayuda de otras moléculas conocidas como sondas de oligonucleótidos (2,3).

En 1977 se desarrolló una técnica para secuenciar el ADN llamada dideoxisecuenciación o técnica de Sanger (cuyo investigador fue Frederick Sanger del British Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology quien recibió el premio Nobel de Química en 1980) la cual emplea una polimerasa del ADN, una muestra de ADN, cebadores, nucleótidos trifosfato y dideoxinucleótidos específicos (ddNTPs) (8).

En 1979 la Corporación Cetus de Emeryville, California contrató a Kary B. Mullis para sintetizar sondas de oligonucleótidos (9).

En 1983 se logró automatizar la síntesis de oligonucleótidos, lo cual fue un notable adelanto puesto que la técnica manual resultaba muy laboriosa (3).

Ese mismo año K. Mullis establece los principios de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), esta técnica se volvió un método sencillo y susceptible de automatización (9).

Hoy en día existen numerosas variantes de la técnica original de RCP que permiten amplificar el DNA en las más diversas condiciones, introducir cambios aleatorios o dirigidos en regiones genéticas determinadas, así como realizar pruebas diagnósticas para localizar mutaciones en secuencias problema, las cuales pueden ser **transicionales** (*un par de purinas-pirimidinas es sustituido por otro*), **transversionales** (*un par de purina-pirimidina es sustituido por un par pirimidina-purina*), y de **corrimiento de armazón** (*implica la inserción de un par de bases extra o supresión de una o más bases del ácido desoxirribonucleico ADN*) (6).

La reacción en Cadena de la Polimeras (RCP) se ha convertido ya en una poderosa herramienta para la investigación básica y aplicada, empleándose tanto en las investigaciones en biología molecular como en el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. No obstante, aún nos encontramos en los comienzos del desarrollo de una de las más prometedoras tecnologías de nuestro tiempo, tanto por la variedad como por la importancia de sus aplicaciones. (10).

En la actualidad dado el potencial para amplificar secuencias de ADN a partir incluso de una molécula, esta técnica ha sido acoplada a metodologías de identificación de individuos por medio de las llamadas huellas génicas, usadas en medicina forense e investigaciones criminalísticas, así como es el caso de restos arqueológicos orgánicos, sin embargo las esperanzas son todavía mucho más numerosas que las realidades, y hará falta algún tiempo para conocer los límites y logros de ésta (11).

LOS MARCADORES GENÉTICOS FORENSES

La individualidad genética de la raza humana es el dogma central de la biología humana. Esta individualidad se define por la combinación de marcadores genéticos que un individuo hereda de sus padres.

Los marcadores genéticos se pueden analizar a nivel de variación de proteínas o a nivel de variación en la secuencia de ADN.

Las proteínas son codificadas por genes en los cromosomas (exones), y el genoma humano presenta dos copias de cada cromosoma, una copia obtenida de cada uno de los padres.

Los genes están localizados en una posición particular (locus) en el cromosoma, pero también pueden existir en formas alternativas, llamadas alelos, los cuales difieren a nivel de la secuencia de ADN. Los genes pueden sintetizar proteínas que exhiben diferentes propiedades, o que pueden tener diferencias no detectables.

Un individuo que pose dos copias idénticas de un gene particular, o copias que sintetizan un solo tipo de proteína se dice que es homocigoto en ese locus. Un individuo que tenga diferentes alelos en un locus particular se dice que es heterocigoto (12,13).

Cuando los dos alelos presentes se expresan por completo se les llama alelos codomiantes, un ejemplo de estos es el que presentan los grupos sanguíneos ABO.

El objetivo de la tipificación de marcadores genéticos es determinar qué alelos están presentes en un loci genéticamente variable.

En el campo de las ciencias forenses, el objetivo del análisis de evidencia biológica ha sido tradicionalmente dirigido hacia la detección de la variación genética expresada a nivel del *grupo sanguíneo y marcadores proteicos solubles*.

Estos métodos de tipificación serológica involucran la separación electroforética de las proteínas y/o la identificación inmunológica de grupos sanguíneos en fluidos corporales. La variación genética en proteínas puede detectarse fácilmente por estos métodos debido a que algunos cambios en la secuencia de aminoácido de una proteína afectará la carga total de la misma, y por lo tanto su movilidad electroforética, mientras que otros cambios pueden alterar un determinante antigénico y afectar las interacciones proteína-anticuerpo (12).

Una clara ventaja de la determinación de los genotipos de diversos marcadores genéticos es el potencial de detectar variación genética más allá de la que resulta en un cambio sobre una propiedad física de una proteína.

De hecho, una gran parte del genoma humano (25%) consiste en secuencias repetitivas de ADN localizado en diferentes regiones de los cromosomas que lo constituyen (figura 2), cuya característica polimórfica inherente proporciona el más reciente banco de información molecular para el diagnóstico clínico e identificación forense.

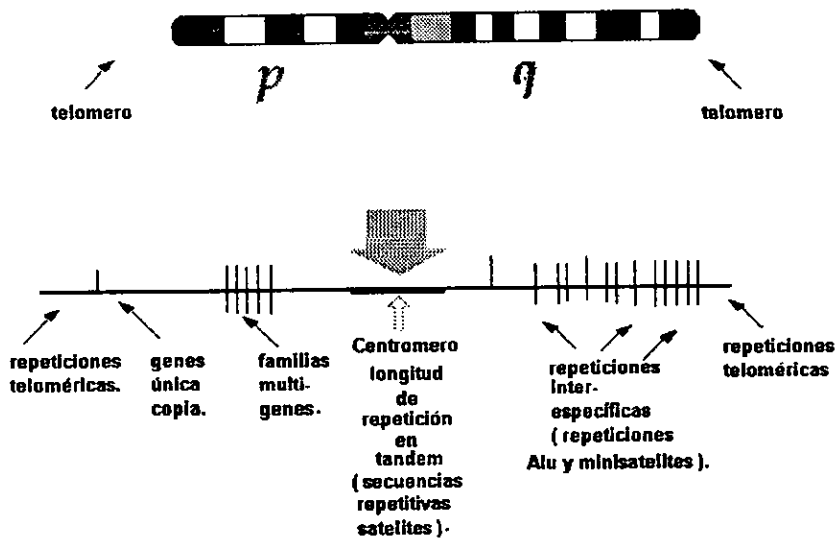


Figura 2.- Organización de la información genética en un cromosoma. Los cromosomas no están solamente bien organizados, si no que además para cada miembro del genoma la organización es diferente, no solo porque lleva diferentes genes, sino porque éste puede llevar secuencias repetitivas específicas. (Wagner R. P.; Raymond P. 1993).

Las secuencias polimórficas son divididas en dos categorías

a).- Los polimorfismos de secuencia: en donde la variabilidad alélica es debida a ciertas diferencias en sitios específicos en la molécula de ADN. En estos loci polimórficos la presencia de varias bases químicas (secuencias polindrómicas) que confiere susceptibilidad a la acción de ciertas enzimas conocidas como endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes del tratamiento enzimático se separan por tamaño por medio de una electroforesis en gel (12,14).

b).- Los polimorfismos de longitud: También pueden presentarse en repeticiones múltiples de segmentos de corta longitud de ADN. En cada uno de los segmentos repetidos de la secuencia es similar, pero el segmento de longitud varía (14).

Entre estas secuencias repetidas del ADN se encuentran el ADN minisatélite, el cual consiste en repeticiones polidispersas, repeticiones de cabeza o cola de un monómero de longitud intermedia (aproximadamente 15 a 70 pares de bases) que ocurren en una región de, unos miles de pares de bases (hasta 20 kb) (15).

Otra clase de repeticiones que se han convertido en el foco de atención para discriminar individuos, son los microsátélites, los cuales son pequeños fragmentos de ADN de menos de 300 pares de bases, que están compuestos por monómeros de 2 a 5 pares de bases, repetidos en tándem y así como los minisatélites, se encuentran dispersos a lo largo del genoma (15).

En ambos tipos de polimorfismos, se puede emplear PCR para amplificar fragmentos de ADN que contengan regiones polimórficas y posteriormente se pueden emplear diferentes estrategias para distinguir los diferentes alelos (16).

El polimorfismo de secuencia se puede detectar de una manera fácil y rápida empleando sondas de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO). Bajo las condiciones adecuadas, este tipo de sondas solo hibridan con las secuencias con las que se aparean perfectamente. (6).

Dentro de este tipo se encuentra el DQ A₁, el cual es un gene que pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad clase II y contiene una región polimórfica dentro del segundo exón el cual se ha empleado exitosamente para la tipificación, de este sistema en el área forense.(17).

Por otro lado los polimorfismos de longitud en los que se incluye a todos los número variable de repeticiones en tándem (VNTRs) de los microsatelites y algunos de los minisatelites, se amplifican fácilmente a través de condiciones típicas de PCR, se les conoce como fragmentos amplificados de longitud polimórfica (AMP-FLPs) cuando son monómeros de 15-70 pares de bases. Desde su descubrimiento, estas regiones han revolucionado el campo de la identificación humana y son responsables del importante progreso en el desarrollo de los mapas de ligamiento genético humano y de nuevos procedimientos para el diagnóstico clínico (18,19 y 20).

Los AMP-FLP requieren escasa muestra, son fáciles de resolver en geles discontinuos de poliacrilamida y se detectan rápidamente por medio de tinciones, con plata o bromuro de etidio.

Entre los sistemas AMP-FLP que se han empleado exitosamente para la tipificación se encuentran el DIS80 y D17S30 (15,16).

A pesar de esto actualmente, sólo se han caracterizado adecuadamente para uso forense pocos sistemas. Por esta razón, el poder de discriminación de estos sistemas no es tan alto como los empleados en el análisis por RFLP. Sin embargo existen como ya se mencionó muchas regiones polimórficas en el ADN humano que pueden explotarse por métodos de análisis con PCR, por lo que en un futuro muy cercano, se va a mejorar el poder de discriminación (21).

SELECCIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS FORENSES ADECUADOS.

Los individuos pueden distinguirse por su perfil de marcadores genéticos. Si el número de marcadores fuera ilimitado, más diferencias entre los individuos serían reveladas. Sin embargo, no todos los marcadores genéticos son adecuados para aplicaciones forenses, y éstos deben seleccionarse cuidadosamente.

Los criterios para evaluar los marcadores genéticos para su uso forense son diversos (tabla 1) Algunos factores se relacionan con el método de análisis y otros con la naturaleza del marcador. Las ventajas de la selección de los marcadores genéticos forenses son que incrementan el poder de discriminación para obtener información útil de muestras forenses (12).

Tabla 1 CRITERIOS PARA EVALUAR LOS MARCADORES GENÉTICOS ADECUADOS.

MÉTODO DE ANÁLISIS
Confiable, rápido, simple de llevar a cabo, consume poco material.
Detecta diferencias cualitativas no ambiguas entre alelos.
NATURALEZA DEL MARCADOR
Heredado independientemente de otros marcadores a ser analizados
Polimórfico con un alto grado de heterocigocidad.
Datos de frecuencia poblacional conocidos.

(Turgeon M. L. 1989).

Vale la pena remarcar la importancia de tener disponible un método analítico que requiera sólo una pequeña cantidad de material para tipificación de muestras forenses. Frecuentemente la cantidad de material encontrado como evidencia disponible para análisis es muy pequeña e irremplazable. Mientras menos cantidad de muestra se consuma en el análisis, habrá más oportunidades de tipificar la muestra y analizar marcadores adicionales. Además, es deseable retener una porción de la muestra para pruebas subsecuentes; esta práctica, se realiza como parte del sistema de chequeo y balance en todas las ciencias que comprenden el sistema judicial (22).

Los tres criterios relacionados con la naturaleza de un marcador genético útil están basados en la información que se puede obtener a partir de estudios genéticos y análisis estadísticos de las frecuencias del gen (alelo) (12).

ASPECTOS FORENSES DEL ANÁLISIS DE LOS MARCADORES GENÉTICOS.

El objetivo principal del análisis forense del ADN es obtener una identificación confiable del donador de la evidencia. Por lo que para lograrlo el análisis debe emplear marcadores genéticos altamente informativos y debe desarrollarse de forma fácil en un laboratorio forense típico en donde, los fluidos biológicos son en mayor frecuencia los elementos clave en la investigación de muchos tipos de crímenes.

En casos de violación, el violador puede dejar semen en la víctima, sobre ropa o en el sitio del crimen. En casos de homicidio la sangre de la víctima puede encontrarse sobre la ropa o sobre el arma del sospechoso. El objetivo de los estudios criminalísticos que lleva el Perito en Genética Forense es determinar, por medio de la tipificación de marcadores genéticos si la evidencia biológica pudo originarse a partir de un individuo en particular, ya sea de la víctima o del sospechoso. Decidir que pruebas de tipificación deben ser aplicadas basándose en el origen, tiempo, y condición de las muestras, seleccionando aquellas pruebas que proporcionen una mayor discriminación.

Si un único marcador genético obtenido a partir de la evidencia no concuerda con el marcador de referencia del individuo en cuestión, entonces el sujeto puede excluirse como el donador del fluido biológico con absoluta seguridad. Si, por otra parte, los marcadores genéticos del individuo concuerdan con todos aquellos obtenidos a partir de la evidencia entonces un origen común es posible.

Una concordancia en la tipificación genética, no constituye una identificación, ya que una porción de la población en general puede también compartir el mismo arreglo de los tipos de marcadores genéticos en cuestión. Por lo tanto, mientras más grande sea la proporción de la población excluida, más grande será el peso de la evidencia.

El perito presenta los resultados de las pruebas de tipificación junto con la interpretación estadística apropiada al jurado o al juez, quienes entonces consideran esta evidencia junto con otras circunstancias del crimen para rendir su veredicto.

ASPECTOS HISTÓRICOS DEL SISTEMA ABO.

El descubrimiento de los grupos sanguíneos es inseparable de la historia, desde el descubrimiento de la circulación de la sangre en 1628, por el médico inglés W. Harvey, se inician las transfusiones de personas con sangre extraída de animales. Pero los accidentes mortales ocasionaron la prohibición de esta práctica (23).

Van Deen en 1861 descubre que la hemoglobina (responsable del pigmento de la sangre) era capaz de asimilar el oxígeno llevándolo a todo el torrente sanguíneo.

Más tarde en 1872 J. Bludell realiza la primera transfusión entre humanos, sin embargo los accidentes seguían ocurriendo por lo que hubo que seguir esperando (24).

Hasta principios de 1900 Landsteiner reconoció la presencia de dos antígenos eritrocitarios diferentes, los antígenos A y B, basado en sus observaciones de las reacciones de aglutinación de los eritrocitos y la presencia de anticuerpos séricos en el suero de individuos dirigidos contra estos antígenos, él estableció la existencia del primer sistema de grupo sanguíneo conocido, el sistema ABO, proponiendo tres grupos diferentes: A, B, y O (25).

Poco después en 1902 Von Decastello y Sturli identificaron un cuarto grupo, el AB (23).

El hallazgo de los grupos sanguíneos dio por resultado el nacimiento de una nueva rama de la biología humana. Fue entonces cuando se comprobó que ningún suero contenía el anticuerpo correspondiente al antígeno presente en los hematies de la misma sangre, pero que, salvo raras excepciones; el anti-A o el anti-B o ambos se encontraban en el suero cuando los eritrocitos no poseían los antígenos correspondientes. (26).

Las reacciones serológicas de los grupos sanguíneos ABO se presentan en la Tabla 2 (23,24).

Tabla 2 CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO.

GRUPO SANGUÍNEO	ANTÍGENOS ERITROCITARIOS	ANTICUERPOS SÉRICOS
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A y B	Ninguno
O	Ninguno	Anti-A y Anti-B

(Turgeon M. L. 1989).

En 1911, Von Dungern y Hirszfeld descubrieron los subgrupos de A, pero nuestros conocimientos actuales derivan de los trabajos de Thomsen Friedenreich, Worsane Friedenreich y Zacho Friedenreich (25).

Los grupos A y AB se dividen en A₁, A₂, y A₁B, A₂B. El suero anti-A (donador del grupo B) contiene dos anticuerpos, anti-A y anti-A₁ ; se cree que A tiene dos antígenos A y A₁, mientras que A₂, tiene sólo uno A (25,26).

Más adelante se comprobó que en los glóbulos rojos del grupo O está presente un antígeno llamado H (figura 3).

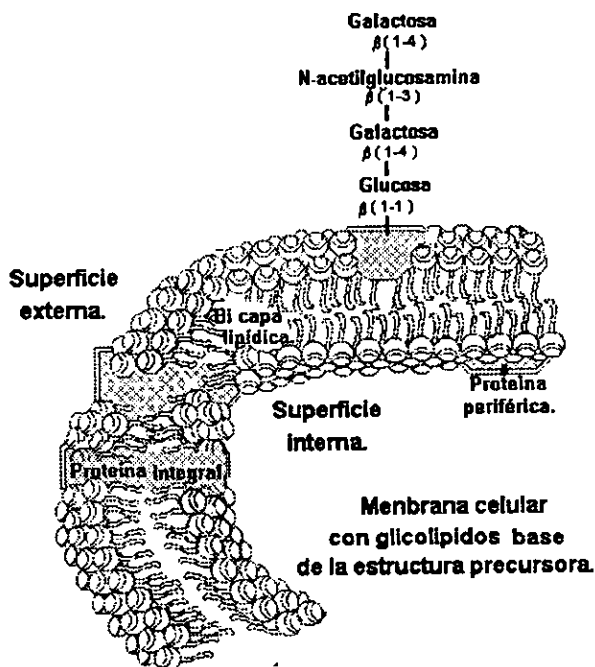


Figura 3.- Los genes ABO no codifican para la producción de antígenos, mas bien producen la glicosil transferasa específica que adiciona azúcares a un precursor, sustancia básica, aquí se muestra la célula sanguínea roja, así como la estructura precursora la cual suministra el azúcar que confiere la especificidad ABO (Harmening D. 1989).

No obstante, pese a su importancia en diferentes campos de la medicina (no olvidemos la medicina legal) los grupos sanguíneos del sistema ABO todavía son poco conocidos, apenas se empieza a comprender cómo se constituyen las moléculas de estos grupos sanguíneos, y a entrever, a través de situaciones patológicas cuáles pueden ser sus funciones (27).

GENETICA DEL GRUPO SANGUINEO ABO

En 1908, Epstein y Ottenberg sugirieron que los grupos sanguíneos ABO eran heredados. Ello se comprobó, en 1910, por von Dungern y Hirsfeld, aún cuando el modo exacto del proceso hereditario fue determinado hasta 1924 que Bernstein postuló la existencia de tres genes alélicos, A, B, y O.

El propuso que un individuo hereda dos genes, es decir que están presentes por duplicado en el cigoto, provenientes tanto de la madre como del padre, y que estos genes determinarían qué antígenos ABO estarían presentes sobre los eritrocitos de la persona. El gene O se describió como amórfico debido a que se produce un antígeno no detectable en respuesta a la herencia de este gen.

En 1927, Furuhashi propuso un esquema para la herencia del sistema ABO, que comprendía dos sitios de mutación, uno para A y otro para B.

En 1930, Thompson propuso la teoría de la herencia de un cuarto alelo, basado en el descubrimiento de von Dungern y Hirsfeld en 1911, el cual demostró que el antígeno A podía dividirse en subgrupos A_1 y A_2 . La teoría de los cuatro alelos de Thompson abarcaba las cuatro formas alélicas A_1 , A_2 , B y O (28)

La expresión de los genes A y B en los eritrocitos o en fluidos corporales resulta de la herencia independiente de los genes Hh, Sese, y A,B.

Se sabe que el locus ABO reside en el brazo corto del cromosoma número 9, clasificado como submetacéntrico (figura 4), mientras que el loci de los genes H y Se, es desconocido. Bajo circunstancias normales, ya sea que el gen A o el B estén presentes en cada cromosoma, el gen puede ser demostrado fenotípicamente sobre los eritrocitos (29).

Las cuatro formas alélicas del sistema ABO (A_1, A_2 , B y O) y fenotipos resultantes se muestran en la Tabla 3 (24).

Los cuatro grupos (A, B, O Y AB), se heredan como caracteres mendelianos (los genes no se mezclan sino que se comportan como unidades independientes pasan intactos de una generación a otra donde pueden o no producir caracteres individuales según sus características de dominancia o recesividad, los genes se segregan al azar produciendo con ellos proporciones predecibles de caracteres visibles en la descendencia) por medio de tres genes alélicos A, B y O. Siendo los genes A y B codominantes (30)

Cromosoma Humano Número 9

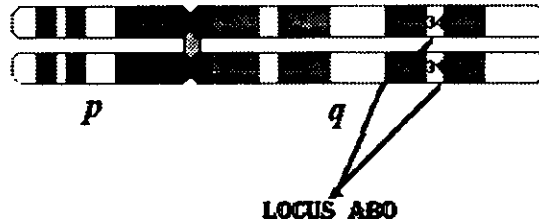


Figura 4.- De acuerdo con la localización del centrómero, hay tres tipos de cromosomas en el humano; a).- Si el centrómero está localizado en la parte media, el cromosoma se llama metacéntrico y, por supuesto, los brazos son visiblemente iguales; b).- Si el centrómero está más cerca de uno de los extremos que del otro, determinándose así claramente un brazo corto y un brazo largo, el cromosoma es submetacéntrico, y c).- Si el centrómero está situado muy próximo a uno de los extremos, quedando un brazo corto muy reducido, el cromosoma es acrocéntrico. Los diez cromosomas acrocéntricos del humano tienen, además, en el brazo corto unas formaciones que recuerdan palillos de tambor y que se denominan satélites (Strickberger Monroe W. 1985)

Tabla 3. FENOTIPOS Y GENOTIPOS ABO PRINCIPALES.

FENOTIPO	GENOTIPOS POSIBLES
A ₁	A ₁ /A ₁ , A ₁ /A ₂ , A ₁ /O
A ₂	A ₂ /A ₂ , A ₂ /O
A ₁ B	A ₁ /B
A ₂ B	A ₂ /B
B	B/B ó B/O
O	O/O

(Turgeon M. L. 1989; Harmening D. 1989).

DESARROLLO DE LOS ANTÍGENOS A Y B

Los antígenos A y B no están completamente desarrollados en infantes recién nacidos, pero se puede detectar un desarrollo antigénico débil sobre los eritrocitos embrionarios a las cinco semanas de edad gestacional. Aunque la fuerza de los antígenos A y B no se incrementa durante la vida fetal, estos antígenos ganan fuerza poco después del nacimiento. Se observan reacciones de aglutinación más débiles con eritrocitos fetales y de recién nacidos comparadas con las de eritrocitos maduros debido a que el número y la fuerza de sitios antigénicos A y B son menores (31)

ACTIVIDADES BIOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE LOS ANTÍGENOS A, B Y H.

El misterio que durante mucho tiempo ha rodeado a los antígenos de los grupos sanguíneos se debe en gran parte a su naturaleza química. En efecto, se trata de moléculas resultantes del encadenamiento de varios azúcares (oligosacáridos) cuyo análisis estructural es largo y difícil.

Los oligosacáridos pueden formar estructuras muy complejas muy variadas y portadoras de numerosos motivos distintos susceptibles de ser reconocidos por anticuerpos. Así, los oligosacáridos de los grupos sanguíneos son el resultado del encadenamiento de algunas decenas de azúcares, como la fucosa, la galactosa, la galactosamina y la glucosamina.

La herencia de los genes A y B son el resultado de la expresión de los productos (antígenos) de los genes A y B sobre los eritrocitos. Pero los antígenos H, A y B no son productos directos de los genes H, A y B, respectivamente (23,24).

Cada gen codifica para la producción de una enzima transferasa específica (Tabla 4), que catalizan la transferencia de una molécula de monosacárido de un sustrato donador a una sustancia precursora (32).

Tabla 4. GENES ABH Y SUS PRODUCTOS ENZIMATICOS.

GEN	ENZIMA
H	α -L-fucosiltransferasa
A	α -3-N-acetil-D-galactosaminil transferasa
B	α -3-D-galactosil transferasa
O	Ninguna

(Harmening DeniseS. 1989).

DESARROLLO DE LOS ANTÍGENOS A Y B

Los antígenos A y B no están completamente desarrollados en infantes recién nacidos, pero se puede detectar un desarrollo antigénico débil sobre los eritrocitos embrionarios a las cinco semanas de edad gestacional. Aunque la fuerza de los antígenos A y B no se incrementa durante la vida fetal, estos antígenos ganan fuerza poco después del nacimiento. Se observan reacciones de aglutinación más débiles con eritrocitos fetales y de recién nacidos comparadas con las de eritrocitos maduros debido a que el número y la fuerza de sitios antigénicos A y B son menores (31)

ACTIVIDADES BIOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE LOS ANTÍGENOS A, B Y H.

El misterio que durante mucho tiempo ha rodeado a los antígenos de los grupos sanguíneos se debe en gran parte a su naturaleza química. En efecto, se trata de moléculas resultantes del encadenamiento de varios azúcares (oligosacaridos) cuyo análisis estructural es largo y difícil.

Los oligosacáridos pueden formar estructuras muy complejas muy variadas y portadoras de numerosos motivos distintos susceptibles de ser reconocidos por anticuerpos. Así, los oligosacáridos de los grupos sanguíneos son el resultado del encadenamiento de algunas decenas de azúcares, como la fucosa, la galactosa, la galactosamina y la glucosamina.

La herencia de los genes A y B son el resultado de la expresión de los productos (antígenos) de los genes A y B sobre los eritrocitos. Pero los antígenos H, A y B no son productos directos de los genes H, A y B, respectivamente (23,24).

Cada gen codifica para la producción de una enzima transferasa específica (Tabla 4), que catalizan la transferencia de una molécula de monosacárido de un sustrato donador a una sustancia precursora (32).

Tabla 4. GENES ABH Y SUS PRODUCTOS ENZIMATICOS.

GEN	ENZIMA
H	α -L-fucosiltransferasa
A	α -3-N-acetil-D-galactosaminil transferasa
B	α -3-D-galactosil transferasa
O	Ninguna

(Harmening DeniseS. 1989).

EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS H, A y B.

Las investigaciones revelan que la especificidad de grupo sanguíneo está asociada con estructuras de hidratos de carbono, con un peso molecular de 3×10^5 a 1×10^6 éstos están compuestos por un 85% aproximadamente de carbohidratos y un 15 de aminoácidos (23).

Sólo una pequeña parte de estos oligosacáridos complejos, constituida por uno o dos hidratos de carbono, representa el motivo antigénico, que es reconocido específicamente por un anticuerpo (33).

Puesto que el material genético contenido en los cromosomas (ADN) lleva información para la síntesis de proteínas, y los genes controlan la formación o funcionamiento de proteínas que son enzimas específicas responsables de la unión de las subunidades de hidratos de carbono (Figura 5). Estas enzimas catalizan la transferencia de azúcares de un sustrato donador activado a cadenas de hidratos de carbono en la molécula precursora (23,24).

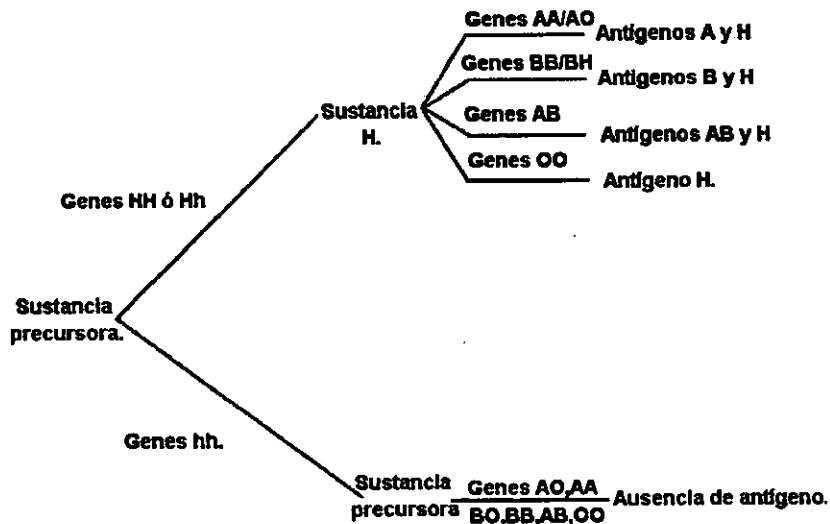


Figura 5. Ruta genética de la expresión de las sustancias ABH sobre la superficie de los eritrocitos. (Turgeon M. L. 1989, Harmening D. 1989).

El *gen H* codifica para la producción de la α -L-fucosiltransferasa que cataliza la adición de L-fucosa (una galactosa) que llevan las células del grupo O, la estructura inmunodominante del antígeno H, a dos estructuras ligeramente diferentes conocidas como cadenas precursoras tipo 1 y tipo 2. Una vez que la transferasa específica del gen H ha actuado y la L-fucosa ha sido añadida a las cadenas, los productos específicos de los genes A y B pueden entonces actuar para añadir un monosacárido a estas cadenas H de soporte (23,24 y 34).

Las enzimas transferasas específicas son los productos de los genes A ó B. Los antígenos A y B resultantes unen los monosacáridos específicos al sustrato H (Figura 6). El *gen A* produce la enzima α -3-N-acetil-D-galactosaminiltransferasa que une una N-acetil-D-galactosamina a la molécula receptora; el *gen B* produce la enzima α -3-D-galactosiltransferasa, la cual une una D-galactosa a la molécula receptora. Debido a que las transferasas A y B convierten a la misma molécula receptora, éstas compiten entre sí por el sustrato. Las células A y B (con antígenos A y B) tienen muchos azúcares inmunodominantes añadidos, lo cual resulta en un bajo nivel de antígeno H detectable sobre eritrocitos A y B (23,24).

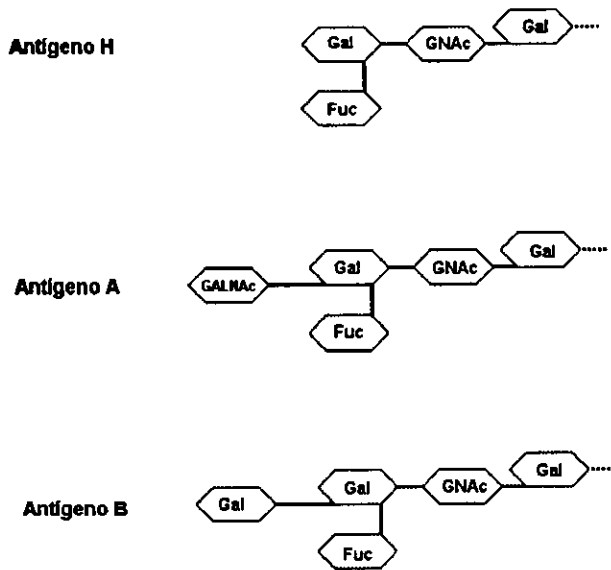


Figura 6: Configuraciones bioquímicas que confieren especificidad antigénica. El carbohidrato residual unido al tercer carbono de la galactosa determina la actividad antigénica. La N-acetil galactosamina confiere la especificidad A y la galactosa confiere la especificidad B. Si la fucosa residual que confiere la especificidad a H no está unida al segundo carbono, la galactosa residual no puede reaccionar ni con la galactosa ni con la N-acetil-galactosamina en el tercer carbono. Donde Gal= Galactosa, GNAc=N-acetil-glucosamina, Fuc=fucosa, GALNAc=N-acetil-galactosamina (Turgeon M. L. 1989, Harmening D. 1989).

GENES MODIFICADORES DEL SISTEMA ABO.

Existen genes supresores (es decir que inhiben las reacciones controladas por otros genes); en el hombre, un ejemplo de gen supresor, es el responsable de un fenotipo poco frecuente, el *Bombay*, descubierto por Bendhey, el cual se caracteriza por la falta de antígeno ABH en la superficie de glóbulos rojos y saliva (23).

A nivel Bioquímico la acción de este gen es la siguiente:

Una enzima Fucosil transferasa que parece ser el producto del gen H, provoca que una molécula de L-Fucosa se pegue al precursor constituyendo la sustancia H (antigénica), esta más tarde es modificada por los genes del sistema ABO, que también codifican para transferasas por cuya acción se unen los azúcares representantes de los oligosacáridos de los antígenos del sistema ABO como se muestra en la figura 7 (35).

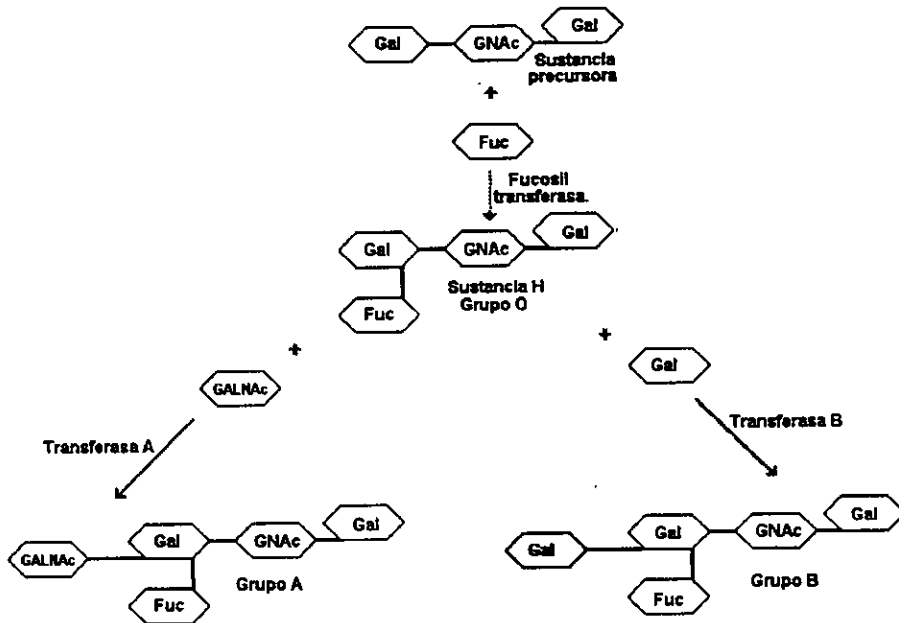


Figura 7.- En el genotipo Bombay debido a la ausencia de la enzima que provoca la adición de la Fucosa a la molécula precursora no se puede formar la sustancia precursora que dará origen a los antígenos del sistema ABO por lo que estos no pueden ser expresados (Watkins W.M 1980)

En el grupo Bombay los individuos no poseen la enzima fucosil transferasa que transforma al precursor en antígeno H. Por lo que no es posible la formación de la sustancia H, siendo imposible que pueda llevarse a cabo cualquier otra reacción que permita a las transferasas adicionar cualquiera de los azúcares que darían origen a los grupos sanguíneos A o B respectivamente (36)

Esta diferencia enzimática explica porqué sus glóbulos rojos y sus otros tejidos no expresen ninguno de los antígenos A, B, o H. Entonces al no existir sustancia H, los genes del sistema ABO no se pueden expresar.

Las personas con genotipo Bombay no reaccionan con los antisueros, Anti-A, Anti-B ni Anti-H y son homocigotos para el gen h (h/h).

Otro gen supresor, es el de los alelos **secretores**, el cual controla que los antígenos H, A y B, sean secretados en los fluidos corporales. Aproximadamente el 97% de las personas secretan antígenos H, H y A, ó H y B hidrosolubles en saliva y otros fluidos corporales como lágrimas y semen. Estas secreciones tienen la misma especificidad que los antígenos ABH sobre los eritrocitos de una persona (Tabla 5). Una segunda forma soluble en alcohol de estos antígenos se presenta en todos los tejidos del cuerpo (excepto cerebro) y sobre los eritrocitos, pero no está presente en secreciones (37).

La producción de antígenos A, B y H en saliva u otros fluidos corporales se controla por medio del gen **secretor** *Se* (en su forma dominante), el cual es heredado independientemente de los genes ABO y H., aunque este control genético se conoce desde el principio de los años 1930 todavía se ignora completamente tanto el locus del gen secretor *Se* y su alelo *se* (forma recesiva), así como los mecanismos bioquímicos y genéticos implicados.

Se sabe que al menos un gen *Se* (genotipo *Se,Se* ó *Se,se*) es esencial para la expresión de los antígenos ABH en secreciones, ya que éste estimula la producción de antígeno H por el tejido, lo que sería incapaz de hacer la forma *se*.

Los individuos que son homocigóticos para *se* (*se,se*) no secretan antígenos H, A ó B a pesar de la presencia de genes H, A ó B (23).

La secreción es solo de los antígenos ABH y Lewis y ninguno de los antígenos presentes en otros grupos sanguíneos es secretado en los fluidos corporales (33).

Los antígenos solubles en alcohol no están influenciados por el gen secretor.

Los antígenos en saliva se detectan por pruebas de precipitación mediante los anticuerpos correspondientes.

Tabla 5 ANTÍGENOS ABH EN SECRECIONES.

GRUPO ABO	ESTATUS SECRETOR	SECRECIÓN
O	Se/Se ó Se/se	H
A	Se/Se ó Se/se	A,H
B	Se/Se ó Se/se	B,H
AB	Se/Se ó Se/se	A;B,H
O	se/se	Ninguno
A	se/se	Ninguno
B	se/se	Ninguno
AB	se/se	Ninguno
O ₁ (Bombay)	Se/Se	Ninguno
O ₂ (Bombay)	Se/se	Ninguno
O ₃ (Bombay)	se/se	Ninguno

(Turgeron M. L. 1989)

PROCEDIMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO ABO EN MUESTRAS DE TIPO FORENSE.

El grupo sanguíneo ABO sigue siendo el más importante en la actualidad. La presencia o ausencia de los antígenos de grupo sanguíneo A y B determinan los 4 grupos del sistema, por lo tanto es importante conocer cuales son las técnicas que permiten tipificar dichos grupos sanguíneos (A, B, AB y O) (28).

Las técnicas empleadas para demostrar la presencia de los diferentes tipos sanguíneos son básicamente inmunológicas y se basan principalmente en la determinación de los antígenos mediante su reacción antígeno-anticuerpo, la cual puede detectarse de varias maneras. Quizá la reacción más simple es la denominada **aglutinación** que tiene lugar cuando el antígeno se encuentra sobre la superficie de una célula. La aglutinación consiste, simplemente, en la formación de conglomerados celulares unidos mediante moléculas de anticuerpos enlazados químicamente con los antígenos de la superficie celular (39).

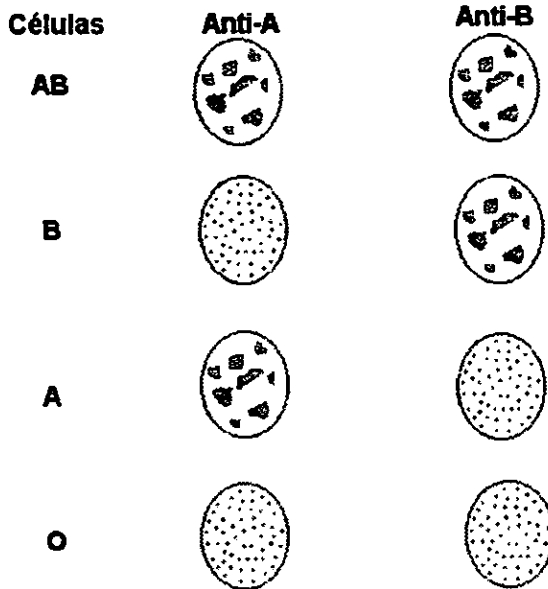


Figura 8: Esquema de las reacciones utilizando sueros específicos Anti-A y Anti-B con células A, B, AB y O. Si la aglutinación es observada con anti-A el grupo sanguíneo es A, si la aglutinación es observada con anti-B el grupo sanguíneo es B, si la aglutinación es observada con anti-A y anti-B el grupo sanguíneo es AB, si no se observa aglutinación con anti-A y anti-B el grupo sanguíneo es O (Watkins W.M. 1980).

Por ejemplo, un anticuerpo específico del antígeno A del sistema ABO de los glóbulos rojos, llamado a menudo anti-A, determina la aglutinación o agrupamiento de las células A y AB pero no de las células B o las O. El anti-B determina la aglutinación de las células B y AB pero no en las A ni las O (figura 7) (40).

La determinación de grupo sanguíneo en muestras de sangre fresca resulta relativamente sencillo, sin embargo, la hematología forense tiene que recurrir a otros métodos que le permitan determinar el grupo sanguíneo en muestras, de sangre seca, líquido seminal, fluidos orgánicos ya que en estos las células se han roto y por lo tanto las pruebas de aglutinación directa no son factibles.

El método tradicional de **adsorción-inhibición**, fue utilizado por varios años para determinar el grupo sanguíneo ABO en manchas de sangre seca. En esta el material antigénico (en forma soluble) se coloca en contacto con su anticuerpo homólogo a fin de efectuar su absorción específica. El anticuerpo en el sobrenadante, se observa con eritrocitos de propiedades antigénicas conocidas. Los resultados serán interpretados como se muestra en la figura 9 (40).

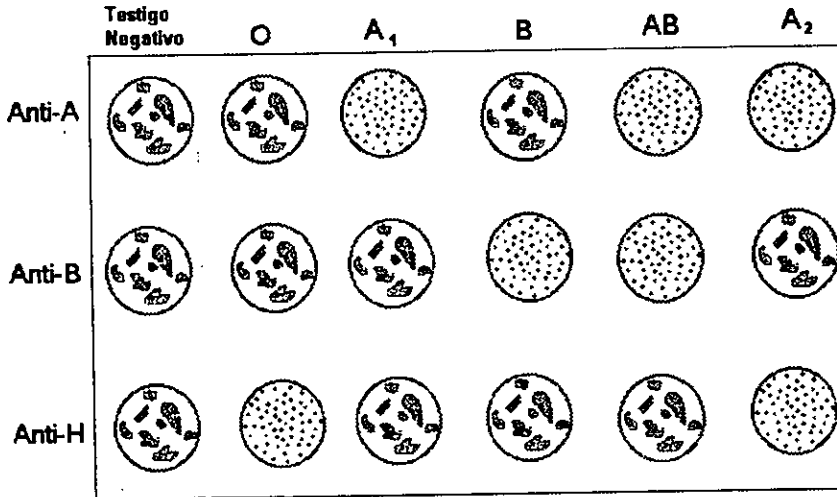


Figura 9.- Si al colocar la muestra que contenga los antígenos se observa aglutinación con anti-A y con anti-B, pero no con anti-H(Lectina), el grupo buscado será O. Si hay aglutinación con anti-B y con anti-H, pero no en el de Anti-A, el grupo corresponderá al A₁. Si no existe aglutinación con anti-A ni con anti-B, pero si con anti-H, el grupo corresponderá al AB. Si se observa aglutinación con Anti-B, pero no la hay con anti-A ni con anti-H, el grupo corresponderá al A₂. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B (Ambriz M. F. 1991).

Otra técnica más reciente es la de **adsorción-elución**, esta técnica tiene como fundamento un primer proceso de absorción específica entre la mancha problema y su anticuerpo homólogo; después de que la absorción es completa, el excedente de anticuerpo se elimina por medio de lavados con solución salina fría. El complejo antígeno anticuerpo se disocia por calentamiento, generalmente a 56°C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con eritrocitos lavados de propiedades antigénicas conocidas; finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células usadas como testigo conocido (figura 10), esta técnica es actualmente la más satisfactoria para la determinación de grupo del sistema ABO en manchas de sangre seca (40)

La técnica de adsorción-inhibición debe ser empleada de todas maneras paralelamente a la anterior para la determinación del grupo en manchas de sangre.

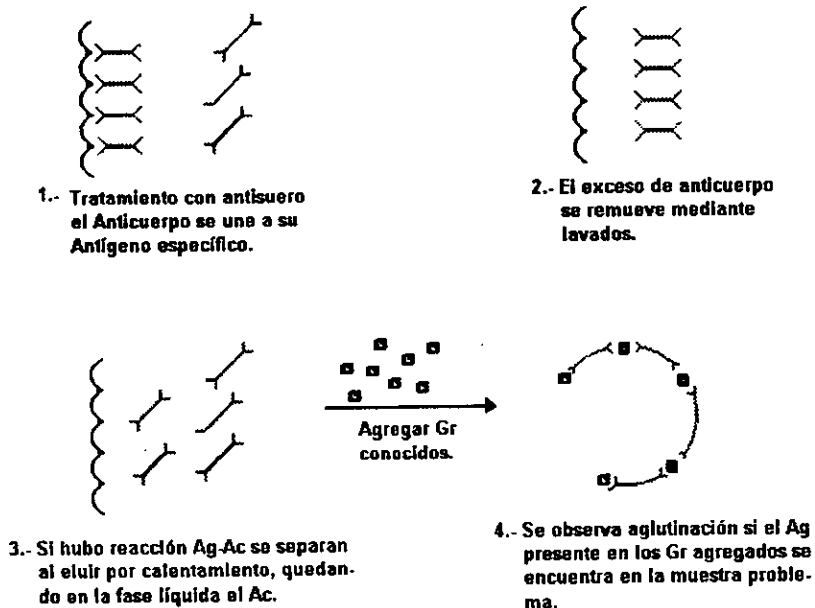


Figura 9: Donde Gr= Glóbulos rojos. Ag= Antígeno. Ac= anticuerpo. Las manchas de sangre se colocan en varios tubos de ensayo adicionar posteriormente antígenos lavados con solución salina estéril. Observándose los siguientes resultados. Si hay aglutinación en el tubo problema al adicionar el anti-A, el grupo corresponderá al A, puede aglutinar ligeramente en el tubo al que se le adicionó anti-AB. Si hay aglutinación en el tubo problema al adicionar el anti-B, el grupo corresponderá al B, puede aglutinar ligeramente en el tubo al que se le adicionó anti-AB. Si hay aglutinación en el tubo problema al adicionar el anti-A, anti-B, y anti-AB pero no en el tubo al que se le adicionó anti-H, el grupo de la muestra analizada corresponderá al AB. Si existe aglutinación en el tubo problema al adicionar el anti-H y simultáneamente en el tubo el cual se le adicionó anti-A, el grupo en cuestión corresponderá al A₂. Si no hay aglutinación en el tubo problema al adicionar el anti-A, el anti-B, pero si en el del tubo al cual se le adicionó el anti-H, el grupo sanguíneo corresponderá al O (M. F. Ambríz. 1991)

Como se puede observar la formación del complejo *antígeno-anticuerpo* es la base de todos los métodos empleados en la detección del grupo sanguíneo del sistema ABO.

FRECUENCIAS DE GRUPO SANGUÍNEO ABO OBTENIDAS POR TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN.

En un estudio realizado por el Banco Central de sangre del Centro Médico Nacional en 1980, con 1215 donadores residentes en el Valle de México, se encontró que la frecuencia de los fenotipos son variables (tabla 6).

FENOTIPO	FRECUENCIA
O	72.02%
A ₁	18.85%
A ₂	0.90%
B	7.01%
A ₁ B	1.13%
A ₂ B	0.09%

(Aguilar M. R. 1982).

DETERMINACION GENETICA DEL SISTEMA SANGUINEO ABO.

Como se mencionó anteriormente, la manera más fácil, para determinar el grupo sanguíneo ABO, es por medio de reacciones serológicas.

Sin embargo para comprender la forma en que está regulada la producción de los antígenos de los grupos sanguíneos ABO es necesario recurrir a otras técnicas distintas que permitan la determinación de las estructuras de los oligosacáridos. Por lo que es necesario aislar el gen que codifica para la enzima que realiza tal o cual operación. Luego se tienen que estudiar las regiones del ADN cromosómico que regula la síntesis de este enzima, para comprender como actúan estas señales de regulación (41).

Se han aislado las secuencias de ADN que codifican algunos enzimas. En especial J. Lowe y sus colaboradores de la universidad de Michigan caracterizaron, en 1966, el ADN de una de las enzimas responsables de la biosíntesis del antígeno H (la α 1-2 fucosil transferasa).

Los trabajos de R. Oriol y R. Mollicone, en 1992, sugieren que existen al menos cinco tipos diferentes de enzimas de tipo fucosil transferasa implicados en la síntesis de los antígenos de los grupos sanguíneos ABO. No obstante, los conocimientos actuales siguen siendo muy fragmentarios. Se sabe que existen varias familias de enzimas, pero todavía se ignora todo sobre los mecanismos moleculares que rigen su producción en la célula. Solo se han podido precisar los mecanismos que presiden la síntesis de los antígenos A y B a partir de la molécula del grupo H. (42).

Después de haber aislado en 1990 por Yamamoto y colaboradores los ADN que codifican las dos enzimas implicados (A y B), se observó que sus secuencias sólo difieren en cuatro nucleótidos, lo que conduce a una diferencia de tan sólo cuatro aminoácidos entre las dos proteínas, así B tendrá una arginina y histidina, mientras que A tendrá una prolina y acidoglutámico. (43)

Los ADN aislados en las células O (con antígenos H) difieren de los ADN A y B por la ausencia de estos nucleótidos, como se muestra en la tabla 7. Esta pérdida al desplazar toda la secuencia del ADN transcrito, lleva a la síntesis de una enzima biológicamente inactiva, incapaz de transformar la molécula H en antígeno A o B (44).

Tabla 7. SECUENCIA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL SISTEMA ABO.

CÉLULA	DIFERENCIA EN SU SECUENCIA
O	5' GGA AGG ATG TCC TCG TGG <u>TA</u> *
	3' GGT GGT GTT CTG GAG CCT G
A u B	5'GGA AGG ATG TCC TCG TGG <u>TG</u> *
	3' GGT GGT GTT CTG GAG CCT G
B	5' GTG GAG ATC CTG ACT CCG CTG
	3' GAA GAA <u>CG</u> *C CCC CA <u>T</u> * GTA G
A u O	5' GTG GAG ATC CTG ACT CCG CTG
	3' GAA GAA <u>CC</u> *C CCC CA <u>G</u> * GTA G

Las primeras dos columnas muestran las secuencias correspondientes al extremo tres de la cadena de ADN que codifica para el sistema de grupo sanguíneo ABO, mientras que las otras dos columnas corresponden al extremo 5 de esta cadena (Crouse C. y Vincek V. 1995)

La secuencia polimórfica del sistema ABO coinciden con la presencia o ausencia de sitios de restricción y esto permite desarrollar técnicas más avanzadas de análisis, basadas en la información genética (ADN) que presenta un individuo, tales como el análisis de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), gracias a la cual es posible llevar a cabo estas determinaciones obteniéndose resultados confiables utilizando una cantidad mínima de muestra (45)

Una manera de simplificar esta forma de identificar los tipos ABO a través de PCR requiere del uso de alelos específico, para amplificar el ADN de las secuencias específicas para cada alelo A, B u O, permitiendo identificar de esta manera mediante una visualización directa en gel de agarosa seis posibles genotipos AB, AA, BB, AO, BO, y OO. (figura 11) (46).

Así, la habilidad de tipificar el grupo sanguíneo a través del ADN en muestras forenses ha revolucionado el campo de la serología forense, anteriormente la tipificación de los diferentes fenotipos estaba limitada al análisis de grupo sanguíneo y algunas proteínas polimórficas solubles por métodos convencionales, sin embargo debido a las limitaciones de la misma metodología, un presunto sospechoso no se podía excluir o no excluir como fuente biológica del fluido en algún caso determinado. Así la habilidad de aislar y tipificar el grupo sanguíneo a través del ADN en muestras forenses ha revolucionado el campo de la criminalística.

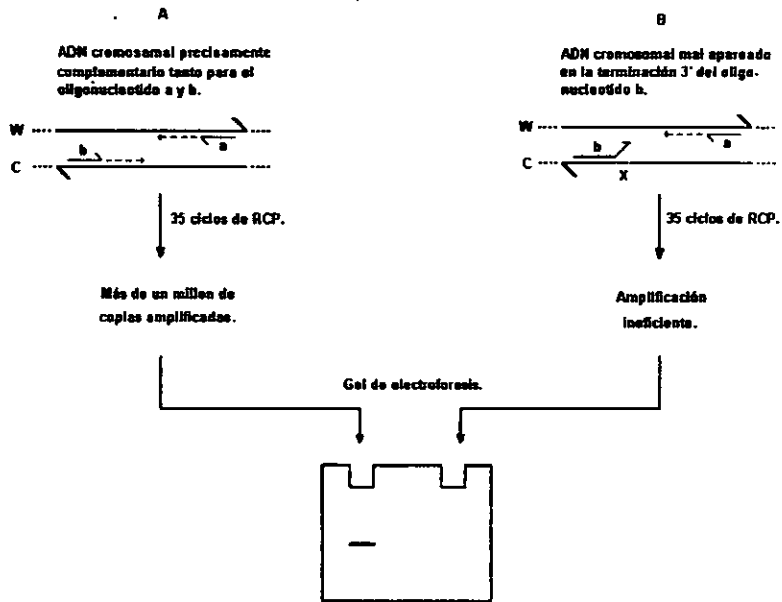


Figura 11: Amplificación por PCR usando oligos alelo -específicos las direcciones 5' y 3' están indicadas por las flechas a la mitad, la X representa la mala alineación en la región 3'. (Botterma et al, 1993).

Sin embargo, el desarrollo de métodos de extracción de ADN a partir de virtualmente todos los especímenes biológicos ha incrementado grandemente el potencial de identificación individual.

El análisis de RFLP fue el primer método basado en el ADN que se aplicó a los problemas de identificación individual. Este método, poderoso en su habilidad para diferenciar individuos, se limita por la cantidad y calidad del ADN requerido para obtener un resultado confiable y por el tiempo que toma el obtener un resultado. A pesar de estas limitaciones, muchos laboratorios continúan usando el análisis de RFLP exitosamente para la detección de polimorfismos de ADN en muestras de casos forenses. Mientras que el campo de la serología forense fue revolucionado por el análisis del ADN, el campo de la biología molecular lo fue por la PCR (47).

La amplificación de un determinado locus del ADN por PCR se adapta idealmente al análisis de muestras forenses de una manera sensible y rápida y no está limitada por el tamaño y la antigüedad del ADN como en el método de RFLP (12).

FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Esta técnica se basa en la acción de una enzima, la ADN polimerasa, la cual es capaz de sintetizar una hebra nueva formada por nucleótidos complementarios, tomando como modelo un fragmento específico de las hebras del ADN. La estrategia consiste en amplificar una secuencia de ADN, en presencia de dos oligonucleótidos o cebadores, que delimitan la región que se va a amplificar, los cuales se unen al extremo 3' de cada una de las cadenas de ADN. El fragmento de ADN sintetizado, generalmente posee de 50 a 2,500 nucleótidos. Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas (figura 12) (48,49):

ETAPAS DE UN CICLO PARA RCP.

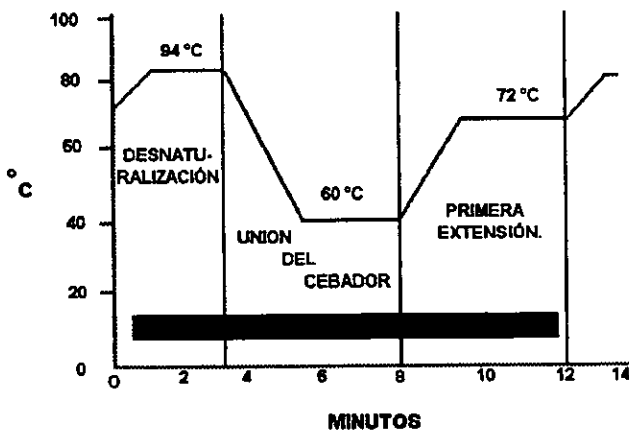


Figura.-12 se muestra de manera gráfica las tres etapas que conforman un ciclo de amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). (Pää bos S. 1990).

1.- *Desnaturalización.* - La doble hélice de ADN se calienta a 94°C, lo que permite romper los puentes de hidrógeno existentes entre las bases de las dos hebras.

2.- *Unión de los cebadores.*- La temperatura se disminuye hasta aproximadamente 50 °C en presencia de los cebadores. Entonces, éstos se unen específicamente en los extremos de la región a amplificar, cada uno en la hebra que le corresponde.

3.- *Elongación.*- La temperatura se eleva a 72°C, la ADN polimerasa alarga las nuevas hebras de ADN a partir de los cebadores, uniendo nucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP).

Estas operaciones constituyen un ciclo de amplificación y resultan dos nuevas copias del fragmento de ADN. En el ciclo de amplificación siguiente, que pasa por las mismas tres etapas, estas nuevas hebras servirán, a su vez, de matrices para la ADN polimerasa. De este modo se obtienen 2ⁿ fragmentos después de n ciclos. El aumento del número de moléculas de ADN es exponencial, como se observa en la figura 13 (50).

ETAPAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

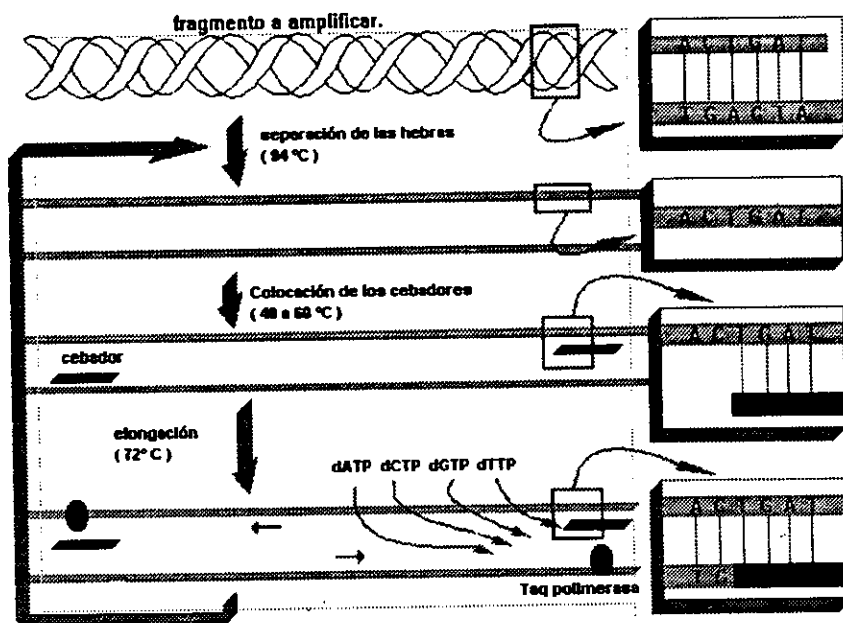


Figura 13.-Etapas que conforman la Reacción en Cadena de la Polimerasa, las cuales están conformadas por separación de las hebras, unión de los cebadores y elongación de los mismos (Innis M.A.; Gelfand D.H. 1993).

Tiempo y Temperatura de Desnaturalización.

Las condiciones típicas de desnaturalización son de 95°C por 30 segundos o 97 °C por 15 segundos; sin embargo temperaturas mayores pueden ser apropiadas, especialmente para moléculas ricas en pares G + C, por las razones antes mencionadas. Solamente se requiere de unos segundos para desnaturalizar al ADN en su T_m (es la temperatura a la cual el 50% de la doble helice se encuentra desnaturalizada, no obstante puede haber un intervalo requerido para alcanzar la T_m dentro del tubo de reacción (51).

La desnaturalización incompleta permite al ADN reasociarse entre sí, ocasionando que se reduzca la amplificación.

En cambio procesos de desnaturalización que son muy largos y/o que la temperatura es muy alta, conducen a una innecesaria pérdida de la actividad enzimática. Debe tomarse en cuenta que la vida media de la ADN Taq polimerasa es: mayor a 2 horas a 92,5°C, 40 minutos a 95°C y 5 minutos a 97.5°C (52).

Unión al Cebador

La temperatura y el tiempo requerido para la unión del cebador a la secuencia del ADN molde depende de varios factores intrínsecos:

- a).- composición de bases (G + C)
- b).- longitud.
- c).- concentración a la que se encuentren

Una temperatura aplicable para la unión es de 5°C por debajo del T_m verdadero de los cebadores. En vista de que la ADN polimerasa Taq es activa en un amplio intervalo de temperaturas, la extensión del cebador ocurre a bajas temperaturas, incluyendo la de la etapa de unión al ADN molde (53).

El intervalo de actividad enzimática varía entre dos órdenes de magnitud, los 20°C y 85°C. Las temperaturas de unión entre 55 °C y 72°C generalmente dan los mejores resultados. A las concentraciones típicas de cebador (0.2 μM) el proceso de unión al ADN molde requiere únicamente de unos segundos, ya que el cebador en la muestra se encuentra en exceso lo que permite una hidridación con el ADN molde casi inmediatamente (54).

Al incrementar la temperatura de unión, aumenta la discriminación del cebador hacia el apareamiento a secuencias incorrectas y se reduce la extensión con nucleótidos incorrectos en el extremo 3' de los cebadores. Por lo tanto, temperaturas de unión estrictas en los primeros ciclos, ayudan a aumentar la especificidad (55)

Para lograr la máxima especificidad en los ciclos iniciales la polimerasa puede ser adicionada después del primer paso de desnaturalización durante el primer periodo de unión (56).

Las temperaturas bajas de extensión, junto con altas concentraciones de dNTPs favorecen las extensiones erróneas de los cebadores así como la extensión de nucleótidos incorporados en forma equivocada (54,55).

En algunas situaciones, únicamente se encuentran disponibles cebadores constituidos por 12 a 15 bases y que requieren de una temperatura de unión de 40 a 45°C. Sin embargo, los cebadores de esta longitud no permanecen unidos al ADN molde a la temperatura de elongación (72°C). El problema puede resolverse aprovechando la actividad parcial enzimática de la polimerasa a bajas temperaturas para elongar los cebadores en cierto número de bases, lo cual los estabiliza. Esto se logra en la práctica por medio de una incubación intermedia a 50-60°C o por un calentamiento gradual de 40 a 72°C.(54).

Los cebadores degenerados frecuentemente presentan múltiples pares mal apareados con el ADN molde, por lo que se sugiere un tratamiento como el antes mencionado.

Elongación del Cebador.

El tiempo requerido para la elongación del cebador depende de:

- a).- la longitud del ADN molde.
- b).- la concentración del ADN molde
- c).- la temperatura de reacción.

Las extensiones se realizan tradicionalmente a 72°C ya que esta temperatura está muy cerca de la temperatura óptima encontrada para la extensión de cebadores unidos al ADN del fago M13 (56).

Estimando la velocidad de incorporación de nucleótidos a 72°C varía de 35 a 100 nucleótidos/segundo dependiendo del amortiguador, pH, concentración de sales y la naturaleza del ADN molde (56).

Un tiempo de elongación de un minuto a 72°C se considera suficiente para productos hasta de 2Kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de elongación pueden ser útiles en los primeros ciclos si la concentración de sustrato es muy baja, o en ciclos avanzados cuando la concentración de producto excede a la concentración de la enzima (57).

El paso de extensión puede ser eliminado si la secuencia que se requiere posee 150 pares de bases o menos, ya que la polimerasa conserva en forma significativa su actividad a temperaturas menores y la elongación completa ocurrirá durante la transición térmica de la temperatura de unión a la desnaturalización (58).

PARAMETROS GENERALES QUE AFECTAN LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La condiciones de la reacción PCR (Tabla 8) que se presentan a continuación deben ser adecuadas para la mayoría de los casos, o por lo menos sirven como condiciones iniciales (59).

Tabla 8.- COMPONENTES DE LA REACCIÓN.

COMPONENTE	SAIKI R. K. (1989)	INNIS M. A. et al (1990)
ADN muestra	10^2 a 10^6 moléculas*	10^3 a 10^6 moléculas*
Cebadores	0.12 μ M	0.2 μ M
Amortiguador Tris HCl (pH 8.4)	10 mM	20mM
ADN Taq polimerasa	2.5 unidades	2 unidades
dNTPs	200 μ M c/uno	50 μ M c/uno
MgCl ₂	1.5 mM	1.5mM
Gelatina o Albúmina Sérica Bovina	100 μ g/ml	100 μ g/ml
KCl	50mM	25mM

*1 μ g de ADN genómico humano de copia sencilla equivale a 3×10^5 moléculas blanco (Persing. 1991, Higuchi 1989)

Concentración de Enzima:

Inicialmente, en la técnica se empleaba la polimerasa I de E.coli, específicamente el fragmento Klenow (PO1I-kF) para la extensión de los cebadores, pero esta enzima se inactiva por las elevadas temperaturas que se requieren para separar las dos hebras del ADN al comienzo de cada ciclo, por lo tanto se requería adicionar enzima fresca a cada nuevo ciclo. (54).

La enzima que da resultados satisfactorios es la obtenida de Thermus aquaticus cepa YT1, que es una eubacteria termófila, descrita por primera vez hace más de veinte años (1969) (55).

El intervalo de concentraciones recomendado para la enzima ADN Taq polimerasa (Perkin - Elmer Cetus) es entre 1 y 2.5 unidades para un volumen de reacción de 100 μ l cuando los demás parámetros se encuentran optimizados. Sin embargo, los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a cebadores o a muestras de ADN particulares (56).

Cuando se desea optimizar una técnica de PCR es recomendable ensayar con concentraciones de enzima que varíen desde 0.5 a 5 unidades / 100 μ l y valorar los resultados por electroforesis en gel (56,60).

Ya que si la concentración de enzima es muy alta, se puede llegar a acumular productos inespecíficos de fondo y si la concentración es muy baja, se produce una cantidad insuficiente del producto deseado (56).

Desoxirribonucleótidos Trifosfato (dNTPs):

Las concentraciones de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) deben ser entre 20 y 200 μ M de cada uno, obteniéndose el balance óptimo de producción, especificidad y fidelidad (55,56).

Los cuatro desoxirribonucleótidos deben de adicionarse en concentraciones equivalentes para minimizar errores de mala incorporación.

Las soluciones patrón de dNTPs deben de neutralizarse a pH 7 y sus concentraciones se determinan por espectrofotometría. Las soluciones ya neutralizadas se pueden obtener de diversas fuentes.

Los estándares se diluyen a 10mM, se dispensan y almacenan a -20 °C es recomendable contar con una solución de trabajo de 1 mM de cada dNTP. La estabilidad de los dNTPs durante los ciclos de PCR es tal que el 50% permanece como dNTP después de 50 ciclos. La especificidad y la fidelidad del RCP se incrementa al emplear menores concentraciones de dNTPs que las que se empleaban cuando se utilizaba el fragmento de Klenow de E. coli (1.5 nM de cada uno) (56,60,61).

Bajas concentraciones de dNTPs minimizan los errores de unión del cebador y reducen la posibilidad de extender los nucleótidos mal incorporados.

En cada caso se debe elegir la concentración mínima de dNTPs que sea suficiente para la composición y longitud de las secuencia requerida. Por ejemplo 20 μ M de cada dNTP en una reacción de 100 μ l es teóricamente suficiente para sintetizar 2.6 μ g de ADN ó 10 pmol de una secuencia de 400 pares de bases (59).

Concentración de Magnesio:

Aporta gran beneficio a la técnica optimizar la concentración de magnesio. Ya que esta concentración puede afectar lo siguiente:

- 1.- Unión del cebador.
- 2.- Temperatura de disociación del ADN que servirá como molde y del ADN que se obtendrá como producto.
- 3.- Especificidad del producto.
- 4.- Formación de artefactos como los dímeros de cebador.
- 5.- Fidelidad y actividad de la enzima.

Generalmente concentraciones excesivas de magnesio resultarán en la acumulación de productos inespecíficos de amplificación, y concentraciones subóptimas del ión disminuyen la producción de ADN (55).

En vista de que los dNTPs aparentemente se unen en forma cuantitativa al ión Mg^{2+} , la cantidad de dNTPs presente en la reacción determinará la cantidad de magnesio libre disponible para la enzima. La concentración de magnesio debe de ser de 0.5 a 2.5 mM por encima de la concentración total de dNTPs. Por ejemplo cuando la concentración total de dNTPs es de 0.8 mM, si se adiciona 1.5 mM de $MgCl_2$ quedara libre 0.7 mM de magnesio para ser utilizado por la enzima. Cuando se modifican las concentraciones de dNTPs hay que compensar modificando también la concentración en el $MgCl_2$ (57).

La presencia de EDTA u otro agente quelante en alguna de las soluciones o en la muestra de ADN puede perturbar la concentración, aparentemente óptima, de magnesio (55).

Selección de Cebadores:

Las concentraciones óptimas de cebadores generalmente son de 0.05 a 0.5 μM , concentraciones mayores promueven la unión equivocada al ADN molde y la acumulación de producto inespecífico, además puede aumentar la probabilidad de generar artefactos como los llamados *dímeros de cebadores*, los cuales son productos de la amplificación del ADN que se observan en el producto de PCR, especialmente cuando se realizan muchos ciclos de amplificación en una muestra que contiene inicialmente muy pocas copias del ADN matriz. Los fragmentos de ADN de doble cadena que se forman, son de longitud similar a la suma del tamaño de los cebadores, debido a que estos se producen por la superposición de algunas bases entre ellos. El resultado de esto, es una elongación de ambos cebadores en la misma molécula. La concentración resultante, es ADN matriz (producto amplificado) muy eficiente que si ocurre en los primeros ciclos del proceso, su amplificación sobrepasa a la del ADN muestra volviéndose el producto mayoritario al final de la reacción.

El mecanismo por el que se forman los dímeros entre cebador no está completamente claro, la observación de cebadores que son complementarios en el extremo 3' están predispuestos a formar estos dímeros sugiere que el evento inicial sea la interacción pasajera que ocasiona que los extremos terminales se encuentren cerca el uno del otro. Diversas polimerasas, incluyendo a la Taq, han demostrado poseer una débil actividad de polimerización no dirigida por un ADN molde, por la cual pueden adicionarse bases a un dúplex despuntado ("blunt-ended") (55,56).

Así los productos inespecíficos y los dímeros de cebador se vuelven sustrato para los subsiguientes ciclos de RCP y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y cebadores, resultando una baja síntesis del producto deseado (56).

La mayoría de los cebadores poseen de 20 a 30 pares de bases y presentan una composición de G + C del 50 al 60%. Se puede sintetizar cebadores más largos, pero generalmente no son necesarios.

Desafortunadamente la selección o diseño de un cebador específico y eficiente sigue siendo de forma empírica. No existe un juego de reglas que aseguren un par de cebadores efectivos. Sin embargo existe una serie de reglas o guías para ayudar en el diseño de un cebador eficiente. Entre ellas se encuentran las siguientes (62).

a).- Generalmente los cebadores poseen 20 a 30 pares de bases y su composición es de 20 al 60% de G + C.

b).- Las T_m calculadas para un par de cebadores deberán estar balanceadas. Para este propósito se pueden calcular otorgándole 2°C a cada A ó T y 4°C a cada G ó C (dependiendo de la amplificación las T_m varían entre 55 y 80°C).

c).- Se debe evitar cuando sea posible, secuencias (de 3 o más) de C o G en el extremo 3' de los cebadores pues estos pueden provocar una unión equivocada en regiones ricas en G + C y también secuencias palindrómicas.

d).- Se recomienda elegir un cebador con una distribución al azar de bases y un contenido de G,C similar al fragmento que se desea amplificar. Se debe de tratar de evitar cebadores que contengan secuencias de polipurinas, polipirimidinas u otras secuencias inusuales.

e).- Evitar secuencias con estructuras secundarias significativa, particularmente en el extremo 3'.

f).- Hay que analizar los cebadores entre sí para asegurar que no exista complementariedad entre sus bases. En particular hay que evitar la complementariedad de los extremos 3' de los cebadores, ya que esto promueve la formación de dímeros de cebadores, lo que disminuye la síntesis del producto deseado (56).

OTROS COMPONENTES DE LA REACCION:

Amortiguador.

Un amortiguador que se recomienda para la técnica de PCR es Tris-HCl de 10 a 50mM (con un pH entre 8.3 y 8.8 medio a 20°C). No se han realizado estudios sobre otros amortiguadores diferentes.

El amortiguador de Tris es un amortiguador iónico, dipolar, que presenta un pKa de 8.3 a 20°C y un delta pKa de de -0.021/°C. El valor real de pH del Tris 20mM (pH 8.3 a 20 °C) varía entre 7.8 y 6.8 en las condiciones típicas de ciclización térmica (56).

Sales.

Para facilitar la unión del cebador con el ADN matriz se puede adicionar hasta 50 mM de KCl. Concentraciones mayores a 50mM inhiben la actividad de la ADN Taq polimerasa. El NaCl puede ser adicionado pero en concentraciones menores a 50 mM, pues de otra forma resulta inhibitorio para la enzima (63).

Detergentes y Proteínas:

La gelatina o albúmina sérica bovina en concentraciones de 100 µg/ml y detergentes no iónicos como el Tween 20 (0.05 al 0.1 %) se incluyen para estabilizar a la enzima. Se prefiere la gelatina a la albúmina sérica bovina, ya que esta última es más fácil que se coagule durante la etapa de desnaturalización además la gelatina se puede esterilizar en autoclave. Varios de los protocolos funcionan adecuadamente sin la presencia de proteína (55).

TECNICAS PARA ANALIZAR PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR.

Los productos amplificados pueden ser analizados por alguna de los siguientes metodos:

(1) Hibridización con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia.

En un ensayo Dot-Blot, los productos de amplificación de RCP se fijan a una membrana de nylon y se incuban con sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (OES) marcadas. Las sondas OES marcadas (con biotina o fosfatasa ácida) hibridizarán sólo productos que contengan la secuencia específica se visualizara un punto colorido cuando el producto de amplificación hibrida con el oligonucleótido específico (Figura 14) (54).

(2) Análisis electroforético de los productos de RCP.

Los productos de RCP que difieren en tamaño debido a secuencias repetidas, deleciones, o inserciones pueden ser analizadas por medio de electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida (48).

(3) Análisis de los fragmentos amplificados en secuenciador por medio de diagramas.

Lo más reciente en análisis de productos de RCP es determinar la secuencia del ADN del producto de amplificación (Figura 14). Una secuenciación enzimática directa de los productos de PCR es posible si dichos productos son parcialmente purificados.

En lugar de fraccionar el ADN con una enzima de restricción, la técnica de amplificación PCR es utilizada para producir millones de copias de solamente la porción específica del cromosoma (54).

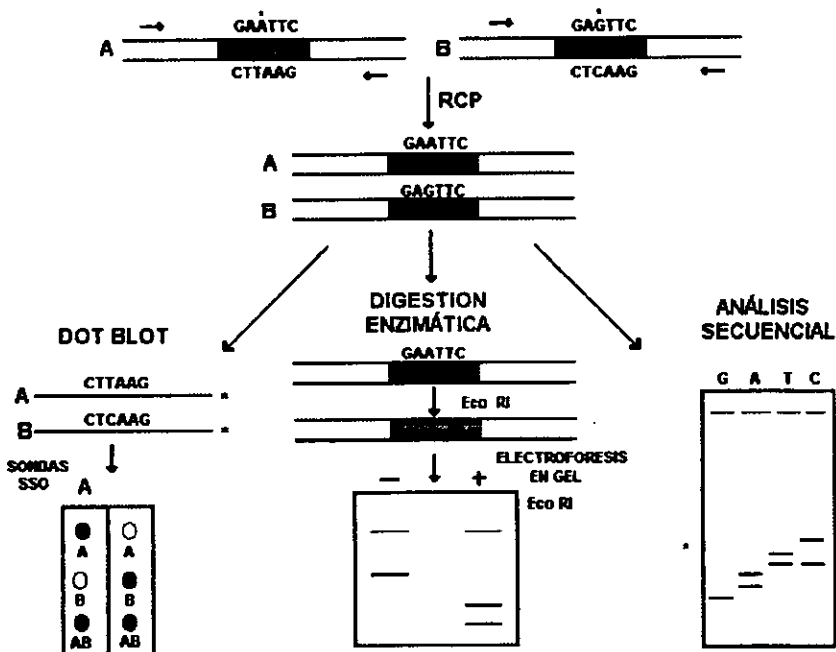


FIGURA 14: Análisis de los productos generados por PCR de los primers (oligonucleótidos) flanqueantes a la región del polimorfismo. Los primers son complementarios a las secuencias conservadas en cada lado del polimorfismo, indicados por las flechas. Tres métodos se ilustran para el análisis de los productos. Al utilizar el método reverso de Dot Blot, los productos de PCR se fijan a una membrana de nylon. Las dos sondas de oligonucleótidos específicos (SSO) marcadas hibridarán con las tiras idénticas bajo condiciones que permitan perfectamente unirse a las secuencias complementarias. La sonda 1 podrá hibridar específicamente con los productos que contengan la secuencia A, y la sonda 2 podrá hibridar con los productos que contienen la secuencia B. Consecuentemente, productos heterocigotos (una mezcla de los productos de secuencia A y B) hibridarán con ambas sondas, mientras que los productos homocigotos hibridarán con una sonda. La electroforesis en gel permite facilitar la determinación de genotipos cuando una secuencia de reconocimiento es afectada por el polimorfismo. Esta técnica permite observar los patrones de homocigotos y heterocigotos por medio de bandas. El análisis de la secuencia de ADN de los productos de PCR provee la secuencia actual del producto a través de la región polimórfica. La posición del polimorfismo se marca con un asterisco (*). Las secuencias son leídas desde el final a la parte superior del gel. La secuencia del producto A es 5'-GAATTC mientras que la del producto B es 5-GAAGTC. La secuencia heterocigota se distingue de la homocigota por la presencia de ambos residuos en la posición polimórfica (Reynolds, 1991).

VENTAJAS DEL USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN EL ÁREA FORENSE

La habilidad para detectar polimorfismos, en el ADN utilizando la tecnología de amplificación por PCR es simple, rápida, y sin paralelos en sensibilidad y aplicabilidad. Como tal, la tipificación de ADN usando la PCR ha distinguido ventajas sobre el método de RFLP.

Primero, la tipificación basada en PCR es más fácil y más rápida de realizar. Los resultados de la tipificación por PCR pueden ser obtenidos en uno o dos días comparado con el tiempo (mínimo un mes) que se requiere para obtener resultados de RFLP.

Una segunda ventaja basada en PCR es su sensibilidad; tan poco como un nanogramo de ADN o menos se requiere para el análisis. Mientras que para la técnica de RFLP se requieren aproximadamente 50ng de ADN de peso molecular alto para el este análisis usando solo una sonda para un loci, y se requiere más de 100ng para analizar varios locus, pero en la practica no siempre se obtiene la cantidad de ADN que se requiere para realizar este tipo de análisis. Este tipo de limitaciones son superadas empleando la PCR ya que el ADN extraído de un simple cabello, manchas pequeñas de sangre, semen y saliva, tejidos, e incluso fragmentos de hueso y dientes se han tipificados usando esta técnica. Además, debido a que los métodos de tipificación basados en la PCR consumen tan poco ADN, los análisis de las muestras pueden repetirse. Un gran logro para el trabajo forense. En contraste, en el análisis de RFLP la repetición no siempre es posible (63).

Otra ventaja de los sistemas de tipificación basados en la PCR es que éstos son menos sensibles al grado de degradación de ADN que los sistemas basados en RFLP. La degradación progresiva de las muestras de ADN conduce a la pérdida de RFLP haciendo el análisis imposible. En contraste, las muestras de ADN degradado extraído de tejidos viejos y materiales sin preservar de hasta 1200 años se han amplificado exitosamente(7). La amplificación de las muestras de ADN degradado requieren sólo que el tamaño del fragmento promedio en la muestra sea igual o exceda al tamaño de las regiones que van a ser sometidas a PCR.

La simplicidad y sensibilidad de la PCR acoplada con la habilidad de tipificar muestras de ADN degradado expande ampliamente los números y tipos de casos que se pueden analizar (65).

HIPÓTESIS

Observando la dificultad para determinar el grupo sanguíneo ABO por técnicas serológicas ya que la mayoría de las muestras biológicas que se trabajan en el área forense no son de muy buena calidad, lo que impide que en muchos casos no se les puedan practicar los análisis adecuados para la determinación de grupo sanguíneo ABO, propiciando que no se pueda detectar si el sospechoso participo o no en el acto criminal, la estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la determinación de las diferentes formas alélicas del sistema ABO (A, B y O) utilizando oligonucleótidos específicos, permitirá determinar este sistema sanguíneo no solo en sangre, saliva o semen, sino en prácticamente cualquier tipo de muestra biológica, con una sensibilidad y especificidad por arriba del 99% al compararla con la técnica serológica.

Considerando que se podrá determinar no solo el fenotipo si no también el genotipo de grupo sanguíneo ABO de una determinada muestra biológica se establecerán las frecuencias genotípicas del locus ABO lo cual no puede hacerse utilizando la técnica serológica y así se contará con otro marcador genético más para el análisis de muestras de tipo forense.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar las formas alélicas del locus AaBb (Genotipo y Fenotipo) y aplicarla como rutina en el área forense.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Obtención de las muestras biológicas de origen humano (mínimo 200 muestras).
- 2.- Determinación fenotípica de los grupos sanguíneos ABO, en muestras de sangre fresca, sangre seca, saliva, semen, y diferentes tejidos.
- 3.- Optimizar las condiciones de reacción para la amplificación enzimática del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los oligo-primers específicos que flanquean el locus AaBb.
- 4.- Determinación genética de los grupos sanguíneos ABO, en muestras de sangre fresca, sangre seca, saliva, semen, y diferentes tejidos.
- 5.- Análisis estadístico de la estandarización de la PCR para la determinación del locus AaBb.
- 6.- Determinar la sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el grupo sanguíneo del sistema ABO.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

La investigación se realizó de acuerdo con un diseño observacional, prospectivo, transversal y descriptivo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron personas del sexo femenino y masculino de edad entre 18 y 40 años, sin parentesco familiar y que nacieron y/o radican en el D.F. o en la zona metropolitana de la ciudad de México.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No se incluyeron personas con parentesco familiar y que no hayan nacido o que no radiquen en el D.F. o en la zona metropolitana de la ciudad de México.

POBLACIÓN

Se estudiaron 210 muestras provenientes de personas voluntarias (visitantes) y de aquellas personas que están relacionadas con alguna de las averiguaciones previas, sin parentesco familiar y que nacieron y/o radican en el D.F. o en la zona metropolitana de la ciudad de México.

VARIABLE

Concentración de Taq polimerasa, Cloruro de magnesio, dNTPS.
Variación del número de ciclos de amplificación .
Concentración de ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS:

D TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.

MATERIAL:

- Ligadura.
- Hisopos ó torundas de algodón.
- Jeringas de plástico estériles (5 ml) o tubos Vacutainer.
- Aguja (calibre entre el 18 al 22).
- Tubos cónicos de 50 ml.

REACTIVOS:

- Etanol al 70%.
- EDTA.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se preparó el tubo en el que colocó la muestra sanguínea, colocando la cantidad de anticoagulante adecuada, para el EDTA se utilizó una concentración al 10% y en una proporción de 0.1 ml por 5 ml de sangre.
- 2.- Una vez obtenida la cantidad necesaria de sangre (3 a 5 ml) se retiró la jeringa de la punción.
- 3.- Se vació la sangre por las paredes del tubo.
- 4.- Se mezcló perfectamente la sangre con el anticoagulante hasta su total homogeneización.

NOTA: Riesgo de infección:

Las muestras de sangre deben manejarse con cuidado para evitar la contaminación del operador y del área de trabajo. El operador que trabaja con materiales de alto riesgo debe usar guantes protectores y si es posible llevar a cabo sus procedimientos en un gabinete de seguridad.

II) DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO POR MEDIO DE REACCIONES SEROLÓGICAS (PRUEBA CELULAR EN LÁMINA).

MATERIAL:

- 200 muestras de Sangre venosa anticoagulada.
- Pipetas estériles desechables.
- Placa de vidrio.
- Aplicadores de madera.

REACTIVOS:

- Sueros comerciales anti-A, anti-A₁, Anti-B y anti-AB.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se colocó una gota de cada uno de los antisueros comerciales (anti-A, anti-A₁, Anti-B, Anti-AB) en una placa de vidrio.
- 2.- Se añadió una gota de sangre anticoagulada a un lado de cada uno de los antisueros comerciales ya depositados en la placa de vidrio.
- 3.- Se homogeneizaron los glóbulos rojos con sus respectivos antisueros, con la ayuda de un aplicador.
- 4.- Se observó si se presentó aglutinación en alguno de los antisueros (la muestra no debe secarse).
- 5.- Se anotaron inmediatamente los resultados de la aglutinación.

III) EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO (ADN) DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS (TÉCNICA DE LIFECODES):

MATERIAL:

- 200 muestras sanguíneas cuyo grupo sanguíneo ABO fué determinado previamente por la técnica serológica.
- Tubos para microcentrifuga.
- Pipetas estériles desechables.
- Cubeta para hielo Fisher.
- Pipeta semiautomática de 1000 µl, 200 µl, 5-50 µl.
- Puntas desechables estériles de 1000 µl., 200 µl, 50 µl.

EQUIPO:

- Microcentrifuga Dupont.
- Agitador Vortex marca Baxter.
- Módulo de calentamiento temp-block equatherm con termostato ajustable.

REACTIVOS:

- Buffer de Lisis Celular (Lifecodes corporation).
- Buffer de Lisis Protéica (Lifecodes corporation).
- Proteinasa K y Hielo.

PROCEDIMIENTO:

Nota: Todos los reactivos deben almacenarse a 4°C durante su uso. Cada muestra se trabaja por separado.

- 1.-Se adicionó un mililitro de sangre total bien mezclada para homogeneizarla, a un tubo de microcentrifuga de 1.5ml. Centrifugue en una microcentrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- 2.-Cuidadosamente se eliminó el plasma, evitando tocar la capa blanca formada.
- 3.-Se adicionó un mililitro de buffer de lisis celular (para lisar los eritrocitos). Se tapó y agito con vortex un minuto.
- 4.- Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decanto el sobrenadante.
- 5.-Se repitieron los pasos tres y cuatro dos veces.
- 6.-Se adicionó un mililitro de buffer de lisis protéica (para romper los leucositos). Se agitó con vortex para resuspender el botón celular.
- 7.-Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se decanto el sobrenadante. Se colocaron las muestras en hielo.
- 8.-Se preparó la mezcla maestra con 225 µl. de buffer de lisis protéica y 25 µl. de proteinasa K (para romper el núcleo y obtener el ADN) por muestra. Se agitó con vortex para mezclar.

Nota: Preparar la siguiente mezcla maestra inmediatamente antes de usarse. Preparar un volumen total suficiente para todas las muestras, más una alícuota extra para compensar las pérdidas por pipeteo. la proteinasa K, debe mantenerse en hielo todo el tiempo.

- 9.-Se procesó una muestra a la vez:

Se adicionó 250 µl. de la mezcla maestra. Se pipeteó hacia arriba y hacia abajo para resuspender el botón. Se mezcló bien. Se colocó el tubo en el thermo-block a 65°C.

- 10.- Se incubaron por 2 horas. Agitándose con vortex cada 15 ó 20 minutos para asegurarse que el botón nuclear se resuspendió.

Nota: Para óptimos resultados el botón nuclear debe resuspenderse completamente.

- 11.-Se agitó con vortex vigorosamente durante 30 segundos después de completar la incubación se centrifugó por 2 minutos.

Nota: El procedimiento puede ser detenido en este punto y las muestras pueden almacenarse a 4°C aproximadamente por un año.

IV).CUANTIFICACION DEL MATERIAL GENÉTICO (ADN) EN GEL DE AGAROSA.

MATERIAL:

- ADN extraído de las 200 muestras sanguíneas..
- Probeta de 100 ml.
- Matraz Erlenmeyer de un volumen tal que pueda contener al menos dos veces la cantidad de buffer añadido.
- Espátula.
- Peines para 14 y 24 posos.

- Molde para gel horizontal de 12 por 14 cm.
- Rollo de masking tape.
- Barra de agitación magnética.
- Pipeta semiautomática de 1-20 μ l.
- Puntas desechables estériles de 20 μ l.
- Puntas para cargar geles desechables estériles.
- Guantes de látex desechables.
- Placas de microtitulación en fondo U.

EQUIPO:

- Balanza semianalítica sartorius.
- Parrilla de calentamiento con agitación Corning.
- Cámara para electroforesis con cubierta modelo 14x11 GIBCO BRL.
- Regulador de poder para cámara de electroforesis de 330 volts GIBCO BRL.
- Mezclador con plataforma orbital de 40 a 400 rpm
- Eagle eye still video system, que se integra de cámara de video, lentes zoom, thermal printer, filtro de interferencia, monitor de video y almacenadora de imagen (Stratagene).

REACTIVOS (VER APENDICE C):

- Agua destilada y desionizada.
- Agarosa grado electroforetico.
- Amortiguador TAE 1X (Tris base 1M, EDTA 0.5M pH 8 , ácido acético glacial y agua)
- Amortiguador de carga Buffer (azul de bromofenol 0.1g ,Tris-HCL 1M pH 8, EDTA 0.5M. glicerol y agua)
- Bromuro de Etidio 1000X (0.5mg/ml).
- Controles de ADN de concentración conocida (1, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30 μ g/ μ L.).

PROCEDIMIENTO:

a) Preparación del gel de agarosa:

- 1.- Preparar los geles de agarosa de acuerdo a la tabla siguiente.

	Gel de cuantificación.
Cantidad de agarosa.	0.8 g.
Cantidad de buffer.	100 ml.
% de agarosa.	0.8 %

- 2.- Se preparo el molde y se nivelo con una burbuja para gel horizontal cubriendo los extremos con cinta masking tape, para tener un molde con las características deseadas.
- 3.- Se midieron 100ml de amortiguador TAE 1X en una probeta, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500ml para evitar que se derramará durante su calentamiento.

- 4.- Se pesaron 0.8g de agarosa grado electroforetico, se adicionó al matraz, y se agitó suavemente se marco sobre el matras el volumen total formado, para restituirlo con agua el que se evapora. Calentándose en un horno de microondas ó en una parrilla de calentamiento hasta que toda la agarosa se disuelva. Asegúrese de que todos los cristales se hayan disuelto antes de proseguir.
- 5.- Después de calentar, se adicionó agua destilada para reemplazar el volumen perdido durante el calentamiento.
- 6.- Se colocó la mezcla en el centro del molde para gel. Se permitió a la agarosa enfriar ligeramente (~60°C) antes de verterla. Se removieron todas las burbujas con una punta o una pipeta desechable del gel sobre el molde. Se colocaron los peines en su posición y se permito que al gel solidificara por 30 ó 60 minutos.

b) Cuantificación de material genético (ADN).

- 1.-Se agitaron con vortex las muestras de ADN que se van a cuantificar por 15 segundos. se centrifugó brevemente para eliminar las impurezas contenidas en el tubo. Se incubó durante 5 minutos a 65°C.
 - 2.- Se centrifugó brevemente para llevar las impurezas al fondo del tubo.
 - 3.-Se retiró la cinta masking tape y los peines del molde. Se colocó el molde dentro de la cámara de electroforesis de manera que los posos del gel se encuentren del lado del electrodo negativo.
 - 4.-Se adicionó a la cámara amortiguador TAE IX en cantidad suficiente para cubrir el gel en su totalidad.
 - 5.-Se adicionaron 3 µl. de amortiguador de carga a cada pozo de la placa de microtitulación. Usando un pozo por muestra.
 - 6.-Se adicionaron 7 µl de los estándares de concentración conocida de ADN en cada pozo del gel. Utilice un pozo por muestra.
 - 7.-Por otro lado se adicionaron 7 µl de las muestras de ADN a cada uno de los pozos de la placa de microtitulación que contenían el amortiguador de carga, se mezcló bien, y se colocaron los 10µl del volumen total de cada muestra en cada pozo del gel.
 - 8.-Una vez que todas las muestras se colocaron en el gel, se realizó la electroforesis a 50 volts durante una hora, o bien hasta que el primer colorante se desplazó únicamente 1.5 cm del punto de aplicación..
 - 9.-Se retiró el gel de la cámara de electroforesis, se colocó en un recipiente plástico, adicionándole agua suficiente para cubrir el gel y entonces se agregaron 5 µl de Bromuro de Etidio 0.5µg/ml..
 - 10.-Se colocó el recipiente en el agitador orbital y se agitó a 50 rpm. durante 5 minutos.
 - 11.-Se realizaron por lo menos tres lavados del gel con agua de la llave por 5 minutos, tirando el agua de cada lavado.
 - 12.-Se fotografió el gel bajo luz U.V.
 - 13.-Se determinó la cantidad de ADN presente en las muestras comparando la banda obtenida con las bandas generadas por cada uno de los estándares.
- Precaución: El Bromuro de Etidio es mutágeno e irritante. Use guantes, evite el contacto con la piel

NOTA: Debido a que para que se lleve a cabo la amplificación del ADN por medio de la técnica de PCR se requiere una concentración que va de 2ng a 25ng se eligieron todas las muestras cuya concentración estuviera dentro de este rango siendo necesario en algunas ocasiones realizar diluciones de las muestras para obtener dicha concentración.

V) HIDRATACIÓN DE LOS OLIGO-PRIMERS (VER APÉNDICE A).

MATERIAL.

- Matraz Erlenmeyer de 1000ml.
- Tubos cónicos de 15ml.
- Pipetas estériles desechables.
- Pipetas semiautomáticas de 1000µl, 1-20µl
- Puntas estériles desechables de 1000µl, 20µl
- Tubos para microcentrifuga de 0.5ml de tapa plana.

EQUIPO.

- Esterilizador Foundry Co. Inc.
- Balanza semianalítica sartorius.
- Agitador vortex marca Baxter.
- Microcentrifuga Dupont.

REACTIVOS:

- Oligonucleótidos (5'Op, 3'Op, 5'Bp, 3'Bp, 5'A/Op, 3'A/Op, 5'A/Bp y 3'A/Bp).
- Agua destilada y desionizada.

PROCEDIMIENTO:

- 1.-Se esterilizarón 300 ml de agua destilada y desionizada a 121°C, a 15 lbs de presión durante 15 minutos.
- 3.-Cada primer liofilizado se hidrato por separado en tubos estériles, utilizando 1ml de agua destilada estéril para cada primer. (Nota: usar puntas estériles).
- 4.- Preparar los stocks de cada primer, de acuerdo a las siguientes indicaciones:

Primer	Tomar	Llevar con agua estéril a	Concentración final
5'Op	1.0µl	1499.1µl	350 pM.
3'Op	1.0µl	1499µL	350 pM.
5'Bp	1.6µl	1498.4µL	525 pM
3'Bp	1.7µl	1498.3µL	525 pM
5'A/Op	1.8µl	1498.2µL	525 pM
3'A/Op	1.7µl	1498.3µL	525 pM
5'A/Bp	1.1µl	1498.9µL	350 pM.
3'A/Bp	1.2µl	1498.8µL	350 pM.

- 5.- Se mezclarón con vortex por 3 minutos.
- 6.- Cada uno de los stocks fuerón almacenados a -6°C .

Nota: Descongelarse cada que se utilizen.

VI DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE LOS COMPONENTES DE LA PCR. (VER APÉNDICE C).

MATERIAL.

- De las 200 muestras sanguíneas cuyo grupo sanguíneo ABO fué determinado previamente por la técnica serológica, se eligieron solo tres cuyos grupos sanguíneos fueron O B y A.
- Tubos para microcentrifuga de 0.5ml con tapa plana.
- Pipetas semiautomáticas de 1000 μl y 1-20 μl
- Puntas estériles desechables de 1000 μl y 20 μl

REACTIVOS.

- Stocks de cada primer preparados en el punto V.
- Taq-polimerasa 5U/ μl .
- Sulfato de amonio 150mM
- Albumina Sérica Bovina (BSA) 1.1 mg/mL.
- Trifosfato de desoxiribonucleotidos (dNTP) 4 mM.
- Buffer I 10X PCR. (Tris-HCl (pH 8.3) 100 mM, KCl 500 mM, MgCl_2 15 mM y gelatina 0.01% (w/v)).

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Las muestra sanguíneas elegidas (O, B y A) se sometieron a la amplificación por PCR.
- 2.- Se utilizarón las mismas condiciones de amplificación marcadas en el punto VI variándose la concentración de los siguientes reactivos.
 - a).- Primeramente sólo se vario la Taq polimerasa para lo cual se utilizarón las concentraciones de 2.0, 2.5 y 3.0 unidades, se realizo la electroforesis de los productos obtenidos.
 - b).-Utilizándose la concentración adecuada de enzima se vario la concentración de cloruro de magnesio usándose 1, 1.5 y 2mM se realizo la electroforesis de los productos obtenidos.
 - b).- Utilizándose la concentración adecuada de enzima y cloruro se vario la concentración de dNTPs para lo cual se utilizarón 150, 200 y 250 μM se realizo la electroforesis de los productos obtenidos.

Nota: Esto se realizo para cada uno de los dúplex.

- 3.- Usándose las concentraciones adecuadas de cada uno de los componentes de las mezclas de reacción se variaron el número de ciclos utilizó 30, 32 y 34 ciclos se realizo la electroforesis de los productos obtenidos.

VII) DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO EN SALIVA, SEMEN, MEDULA Y PIEL. (VER APÉNDICE D).

- a).- Se extrajo el material genético o ADN, de tres muestras de saliva, tres de semen y cuatro de tejido..
- b)- Se siguieron los procedimientos marcados con los siguientes puntos:
 - IV.- Cuantificación del material genético (ADN) en gel de agarosa.
 - XI Amplificación de las muestras.
 - XI -Electroforesis.
 - XII.- Identificación de los alelos presentes.

VIII) PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS DE REACCIÓN (VER APÉNDICE B).

MATERIAL.

- Tubos para microcentrifuga de 0.5ml con tapa plana.
- Pipetas semiautomáticas de 1000 μ l y 1-20 μ l
- Puntas estériles desechables de 1000 μ l y 20 μ l

REACTIVOS.

- Stocks de cada primer preparados en el punto 4 del V.
- Taq-polimerasa 5U/ μ l.
- Sulfato de amonio 150mM
- Albumina Sérica Bovina (BSA) 1.1 mg/mL.
- Trifosfato de desoxiribonucleotidos (dNTP) 4 mM.
- Buffer I 10X PCR. (Tris-HCl (pH 8.3) 100 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM y gelatina 0.01% (w/v)).

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se usarán puntas estériles, para añadir la cantidades encontradas como optimas para cada uno de los reactivos que conforman la mezcla de reacción de la PCR, en los tubos para microcentrifuga de 0.5ml con tapa plana:

MEZCLA DE REACCIÓN PARA EL DÚPLEX 1	MEZCLA DE REACCIÓN PARA EL DÚPLEX 2	VOLUMEN (µl)	CONCENTRACIÓN EN LA REACCIÓN.	CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK
5'Op	5'A/ Bp	7.0	17.12 pM	350pM
3'Op	3'A/ Bp	7.0	17.96 pM	350pM
5'Bp	5'A/ Op	7.0	26.25 pM	525pM
3'Bp	3'A/ Op	7.0	25.56 pM	525pM
Buffer 10X RCP	Buffer 10X RCP	5.0	50mM	10X
Taq polimerasa	Taq polimerasa	0.5	2.5U	5U/µl
Mg Cl ₂	Mg Cl ₂	1.5	1.5 mM	50 mM
dNTP	dNTP	2.5	4 mM	200 µM
(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	30 mM	150 mM
BSA	BSA	7.0	8 µg	1.1 mg/ml

Nota: Preparar las mezclas de reacción inmediatamente antes de usarse.

IX) AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS.

MATERIAL:

- 200 muestras de sangre, 3 de saliva, 3 de semen, 2 de medula y 2 de piel.
- Tubos para microcentrifuga de 0.5ml. con tapa plana.
- Pipetas semiautomática de 1-20µl.
- Puntas estériles desechables 20µl.

EQUIPO:

- Microcentrifuga Dupont.
- Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se añadirón 4ng de la muestra de ADN problema al tubo que contiene la mezcla de reacción para el dúplex 1 y dúplex 2.
- 2.-Se centrifugó la muestra y se colocó dentro del termociclador.
- 3.- Programar el Thermal-cycler bajo las siguientes condiciones:

PRECALENTAMIENTO	32 CICLOS			TEMPERATURA FINAL
94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
30 segundos	59 segundos	69 segundos	48 segundos	10 minutos

4.- Una vez terminados los ciclos se retiraron las muestras y se procedió a realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida. Para determinar los alelos correspondientes.

Nota: Cada muestra se amplifica dos veces una con el dúplex 1 y otra con el dúplex 2.

X) PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA. (VER APÉNDICE C)

MATERIAL.

- Dos placas de vidrio de 17 X 32 cm.
- Peine de 20 pozos
- Espaciadores de 0.8mm.
- Matraz Erlenmeyer de 100ml.
- Agitador magnético
- Cinta canela.

EQUIPO.

- Parrilla de calentamiento y agitación.

REACTIVOS.

- Etanol.
- Agua destilada.
- Buffer 10X TBE.
- Persulfato de amonio al 10% p/v (APS).

TEMED

- Acrilamida al 30 %.

PROCEDIMIENTO:

1.- Preparación del molde para el gel.

- 1.1.- Las placas de vidrio se limpiaron perfectamente. Para asegurar que todos los residuos de detergente fueron removidos se limpiaron las placas con etanol al 95% y se limpiaron con toallas de papel que no dejan residuos.
- 1.2.- Se colocaron espaciadores de 0.8mm de grosor a lo largo de los bordes derecho, izquierdo e inferior de la placa, se sobre puso la otra placa de vidrio.
- 1.3.- Se sujetar ambas placas con ayuda de cinta adhesiva canela.
- 1.4.- Se elevó la parte abierta del molde de tal forma que la terminal abierta quedo más elevada que la terminal sellada. Esta orientación facilitó tanto la entrada del gel como la eliminación de burbujas de aire que se formaron durante el vaciado del gel.

2.- Preparación del gel: Preparar todas las soluciones usando agua destilada ó desionizada estéril.

- 2.1.- Se adicionaron 35ml de agua destilada ó desionizada estéril a un matraz Erlenmeyer de 100ml perfectamente limpio.
- 2.2.- Se adicionario 5ml de amortiguador 10X TBE al matraz, se agitó para mezclar.

2.3.- Se adicionaron 8.5 de acrilamida al 30% (Para obtener una concentración del gel al 8%) se agitó para mezclar completamente. La acrilamida debe estar a temperatura ambiente antes de usarse.

Nota: Los pasos 2.4 al 2.6 deben ser llevados a cabo en una sucesión rápida ya que la adición del APS y del TEMED iniciaran el proceso de polimerización.

2.4.- Se adicionan 6350µL de APS al 10% y 25µl de TEMED al matraz. Se agitó hasta mezclar completamente. Se evito introducir burbujas de aire.

2.5.- Se vertió inmediatamente la mezcla entre las placas de vidrio, gel lentamente y manteniéndose el flujo tan continuo como fuera posible. Evitándose la formación de burbujas de aire, golpeando cuidadosamente las placas para eliminar cualquier burbuja.

2.6.- Se insertó el peine en la parte superior del gel, con cuidado de no formar burbujas alrededor de los dientes del peine. Colocándose el gel sobre una superficie plana.

2.7.- Se permito la polimerización del gel en una posición horizontal por lo menos 45 min. antes de realizar la electroforesis.

XI) ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

MATERIAL.

-Los productos de PCR de cada una de las 210 muestras biológicas amplificadas.

-Pipetas semiautomáticas de 1-20µl.

-Puntas estériles desechables de 20µl.

-Placa de microtitulación con fondo U.

EQUIPO.

-Cámara para electroforesis vertical con cubierta GIBCO BRL. modelo 17x16.

-Regulador de poder para cámara de electroforesis de 300 volts GIBCO BRL.

REACTIVOS:

-Azul de bromofenol

-Marcador de peso molecular de 100 pb GIBCO BRL.

-Buffer 0.5X TBE (5.4 g Tris base, 2.5 g ácido bórico, 2.0 g EDTA, 1000 ml agua destilada)

PROCEDIMIENTO:

1.- Electroforesis blanco del gel.

1.1.- Después de que el gel se polimerizó, se adicionó amortiguador 0.5X TBE al rededor del peine, se quitó cuidadosamente.

1.2.- Se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis vertical adicionándose amortiguador 0.5X TBE a la cámara superior. Cuidadosamente se llenaron los pozos del gel con amortiguador 0.5X TBE usándose una pipeta .

- 1.3.- Se llenó la cámara inferior con amortiguador 0.5X TBE. Se eliminó cualquier burbuja de aire que quedó atrapada entre el fondo y los vidrios que forman el molde y el amortiguador de la cámara inferior.
- 1.4.- Asegúrese de que la cámara de poder este apagada antes de conectarla al aparato. Conectar los cables de tal manera que el electrodo positivo el cual generalmente es de color rojo se encuentre en el fondo de la cámara de electroforesis.
- 1.5.- Se realizó un corrimiento por 20min a 100 volts sin adicionar muestras ni marcadores. Este tiempo se usó para preparar las muestras.

2.- Preparación de las muestra y electroforesis del gel.

- 2.1.- Se prepararon las muestras mezclando 1 μ l de amortiguador de carga y 9 μ l de los productos de amplificación.
- 2.2.- Se preparó el marcador de peso mezclando 1 μ l de amortiguador de carga y 9 μ l del estándar.
- 2.3.- Después de que la fuente de poder fue desconectada, se llenaron cuidadosamente los pozos con las muestras usando pipetas semiautomáticas. Tenga cuidado de no introducir burbujas dentro del pozo.
- 2.4.- Se conectó el aparato de electroforesis a la fuente de poder de tal manera que el electrodo positivo se adaptó al cátodo ubicado en la parte inferior de la cámara .Se encendió la fuente de poder a un voltaje constante de 140 volts por 1 hora.
- 2.5.- Después de que el gel corrió las 3/4 partes se desconectó la fuente de poder y se removieron las placa del aparato de electroforesis.
- 2.6.- Se separaron las placas y se removió el gel.

XIII DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO CORRESPONDIENTE ATRAVÉS DE LOS ALELOS PRESENTES.

MATERIAL,

- Puntas estériles desechables de 20 μ l
- Pipeta semiautomática de 20 μ l

EQUIPO.

- Mezclador con plataforma orbital de 40 a 400 rpm. New Brunswick Scientific.
- Eagle eye still video system, que se integra de cámara de vídeo, lentes zoom, thermal printer, filtro de interferencia, monitor de vídeo y almacenadora de imagen. Stratagene.

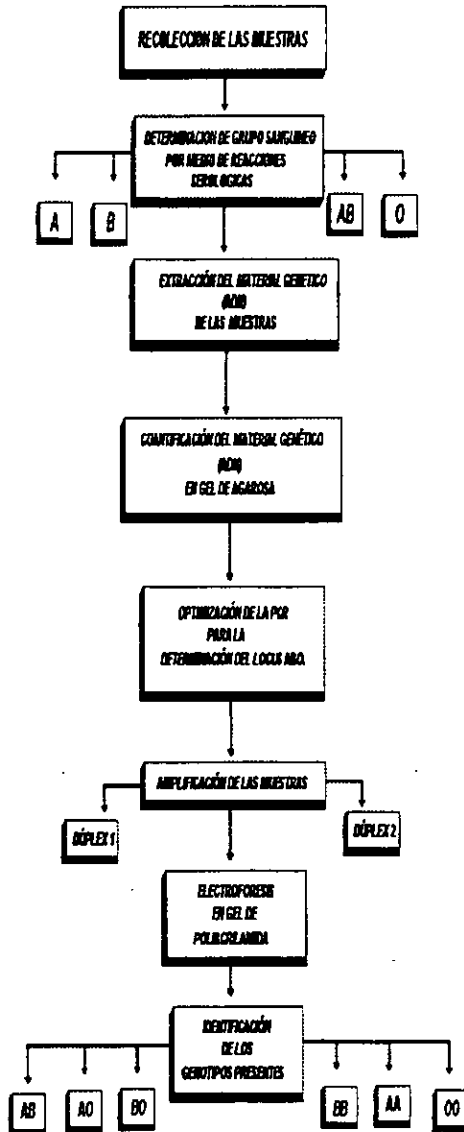
REACTIVOS:

- Bromuro de Etidio 1000X (0.5mg/ml).

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Introducir el gel en un recipiente de plástico y añadir agua suficiente para cubrirlo.
- 2.- Se añadieron 5µl de Bromuro de etidio (0.5µG/ml).
- 3.- Se colocó el recipiente en el agitador orbital y se agitó durante 5 min.
- 4.- Se retiró el recipiente del mezclador agitador, se retiró el bromuro de etidio y se efectuaron tres lavados con agua..
- 5.- Se adicionó agua suficiente para cubrir el gel, colocándose el recipiente sobre el agitador y se agitó durante 15min.
- 6.- Se repitió 3 veces más del punto 4 al 5.
- 7.- Después de los lavados el gel se colocó sobre la lámpara de ultravioleta.
- 8.- Bajo medidas de protección de la luz UV, tome fotografías de las bandas que fluorescen.
- 9.- Se identificaron los alelos presentes.
- 10.- Se determinó el grupo sanguíneo.

DIAGRAMA DE FLUJO
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



DISEÑO ESTADÍSTICO

Las pruebas estadísticas que se presentan a continuación, permiten demostrar la confiabilidad de una técnica o método.

Los resultados fueron sometidos al análisis estadístico propuesto en el teorema de Bayes.

Matemáticamente los términos involucrados en este análisis son interpretadas como sigue:

La **sensibilidad** es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando realmente se tiene determinado grupo sanguíneo (GS), y se representa:

Como $P (+/GS)$ (probabilidad P , de que la prueba sea positiva +, dado /, que se presenta determinado grupo sanguíneo GS).

$$S = P (+/GS)$$

La **especificidad** es la probabilidad de que la prueba sea negativa cuando realmente no se tiene determinado grupo sanguíneo (GS) y se representa:

Como $P (-/NGS)$ (probabilidad P , de que la prueba sea negativa -, dado /, que no se presenta determinado grupo sanguíneo NSG)

$$E = P (-/NGS)$$

Para calcular dichas características, **sensibilidad** y **especificidad** de la PCR, se utilizó la tabla de contingencia estadística para el teorema de Bayes.

		TÉCNICA DE REFERENCIA (SEROLÓGICA)		
		+GS	-GS	Total
TÉCNICA A EVALUAR (PCR)	+GS	a	b	a + b
	-GS	c	d	c + d
	Total	a + c	b + d	a + b + c + d

DONDE: a= es el número de casos verdaderos positivos, b= es el número de casos falsos positivos, c= es el número de casos falsos negativos, d= es el número de casos verdaderos negativos.

En donde la *sensibilidad* se calcula al dividir el número de casos verdaderos positivos entre el total de personas que presentan el grupo sanguíneo esperado.

$$\hat{P}(+/GS) = \frac{a}{a+c}$$

El valor de la *especificidad* se calcula al dividir el número de casos verdaderos negativos entre el número total de personas que no presentan ese grupo sanguíneo esperado.

$$\hat{P}(-/NGS) = \frac{d}{b+d}$$

En este caso para obtener tanto la *sensibilidad* como la *especificidad* de la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa para la determinación del grupo sanguíneo ABO, se utilizó el teorema de Bayes en el cual se tiene que:

$$\hat{P}(GS/+) = \frac{\hat{P}(+/GS)\hat{P}(GS)}{\hat{P}(+/GS)\hat{P}(GS) + \hat{P}(+/NGS)\hat{P}(NGS)} = \frac{\hat{P}(+/GS)\hat{P}(GS)}{\hat{P}(+)}$$

$$\hat{P}(GS/-) = \frac{\hat{P}(-/NGS)\hat{P}(NGS)}{\hat{P}(-/NGS)\hat{P}(NGS) + \hat{P}(-/GS)\hat{P}(GS)} = \frac{\hat{P}(-/GS)\hat{P}(GS)}{\hat{P}(-)}$$

Donde $P(GS)$ es la probabilidad a priori de poseer determinado grupo sanguíneo, es decir, es la probabilidad de que la muestra presente ese grupo sanguíneo en una población en particular, por lo que se tiene:

$$P(NGS) = 1 - P(GS)$$

La probabilidad de que la muestra realmente presente determinado grupo sanguíneo está dada por los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) los cuales se calcularon como sigue:

$$VPP = \frac{a}{a+b}$$

$$VPN = \frac{d}{c+d}$$

Finalmente la confiabilidad diagnóstica de la PCR en comparación con la técnica serológica se calcula con la siguiente fórmula.

$$CD = \frac{(a+d)}{(a+b+c+d)}$$

Finalmente se calcula el poder de discriminación (PD) mediante la siguiente fórmula:

$$PD = \sum P_i^2$$

En donde $\sum P_i^2$ es la sumatoria de los cuadrados de las frecuencias relativas de los genotipos diferentes encontrados.

RESULTADOS.

a).- DE LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO ABO POR LA TÉCNICA SEROLÓGICA.

Se les determino el grupo sanguíneo ABO por la técnica serológica a 210 muestras biológicas (200 de sangre total, 3 de saliva, 3 de semen, 3 de medula y 2 de piel) provenientes de personas voluntarias (visitantes de la PGJ) y de aquellas que estuvieran relacionadas con alguna de las averiguaciones previas y que no compartieran parentesco familiar, no pudiéndoseles determinar este grupo a 4 de estas muestras (cuadro 1).

CUADRO 1. DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DEL GRUPO ABO.

NÚMERO DE MUESTRAS	FENOTIPO DETERMINADO POR AEROLOGÍA
119 Sanguíneas	O
17 Sanguíneas	A
11 Sanguíneas	B
28 Sanguíneas	A
21 Sanguíneas	B
4 Sanguíneas	A/B
2 Saliva	O
1 Saliva	A
3 Semen	A
1 Medula	.*
1 Medula	.*
2 piel	.*

.*No pudo ser obtenido el fenotipo sanguíneo por la técnica serológica.

b).- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA PCR.

Una vez extraído el material genético, de las 200 muestras sanguíneas a las cuales se les determino el grupo sanguíneo por serología sólo se eligieron tres muestra una cuyo grupo sanguíneo correspondiera al O,A y B.

Se les cuantifico el ADN por comparación visual en un gel de agarosa utilizando estándares de concentración conocida, la muestra perteneciente al grupo sanguíneo O, presento una concentración de 4ng/μl, la concentración de la segunda muestra correspondiente al grupo sanguíneo B, fue mayor a los 30ng/μl y finalmente la muestra del grupo sanguíneo, presento una concentración de aproximadamente 4ng/μl (figura 15).

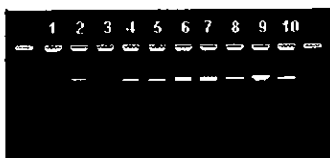


Figura 15.- Cuantificación del ADN obtenido por la extracción no orgánica (Lifecode): de las tres muestras sanguíneas elegidas. Del carril 1 al 7 se observa el corrimiento de los controles de ADN de concentración conocida que van de 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 y 30ng/μl respectivamente. En el carril 8 se muestra el corrimiento de la muestra correspondiente al grupo sanguíneo O/O. En el carril 9 se observa el corrimiento de la muestra correspondiente al grupo sanguíneo B/O, y por ultimo el carril 10 muestra la concentración de la muestra correspondiente al grupo A/O. Las muestras fueron corridas utilizando 7μl tanto de la muestra como de los controles con 1μl de amortiguador de carga y fueron corridas a 90 volts por 30 minutos.

Determinación de la concentración optima de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción para la PCR.

La tres muestras elegidas (A; B Y O), fueron amplificadas usando el protocolo descrito por Office Crime Laboratory (44). Para todas las amplificaciones se partió de una concentración de 2ng de ADN en un volumen final de 60μl, y todas las muestras fueron amplificadas como sigue:

PRECALENTAMIENTO		32 CICLOS		TEMPERATURA FINAL	
94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	72°C
30 segundos	59 segundos	69 segundos	48 segundos	10 minutos	

Se procedió variando los siguientes parámetros, primeramente fue la concentración de la enzima Taq polimerasa, usando 2.2.5 y 3U (figura 16). Donde tanto para el dúplex 1 como para el dúplex 2 la concentración de 2.5U de enzima optimizaron la reacción.

Utilizando 2.5U de enzima se evaluaron las concentraciones de 1, 1.5 y 2mM de cloruro de magnesio, en ambos dúplex. La concentración que optimizó la reacción para los dos dúplex fue de 1.5mM de cloruro de magnesio (figura 17).

Usando 2.5U de Taq polimerasa y 1.5mM de cloruro de magnesio se determino que con la concentración de 150 μ M dNTPs no se obtiene la amplificación deseada, mientras que tanto con 200 μ M como con 250 μ M si se obtiene el producto de PCR en ambos dúplex, por lo que se eligió como concentración optima de este componente la de 200 μ M en los 60 μ l de reacción para minimizar errores de incorporación.. (figura 18).

Utilizando la concentración optima de Taq polimerasa, Cloruro de Magnesio y dNTPs se determino que el número de ciclos óptimos para ambos dúplex , es de 32 ciclos, ya que con 30 ciclos no se obtienen productos de PCR, lo que si ocurre cuando se utilizan 34 ciclos de reacción peor sin aumentar la concentración de los productos obtenidos con 32 ciclos..(figura 19).

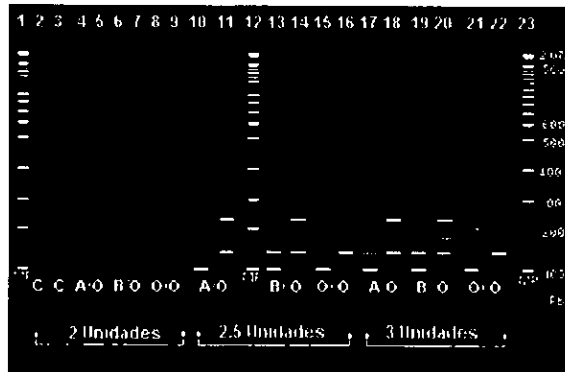


FIGURA 16.- Efecto de la concentración de Taq polimerasa en la amplificación del locus AaBb. Los productos de amplificación (10 μ l) se corrieron electroforéticamente en gel de poliacrilamida a 140 volts por 45 min. En los carriles 1, 12 y 23 se observa el corrimiento del marcador de peso molécula de 100pb. En los carriles 2 y 3 se percibe el corrimiento de los blancos de reacción correspondientes al Dúplex 1 y 2 respectivamente. Del carril 4 al 9 se muestra el corrimiento de las muestras (A/O, B/O Y O/O) amplificadas utilizándose 2U de enzima. Del carril 10 al 16 se visualiza el corrimiento de las amplificaciones con 2.5U . y finalmente en los carriles 17 al 22 se presenta el corrimiento de los productos de PCR en los que se utilizó 3U de enzima.

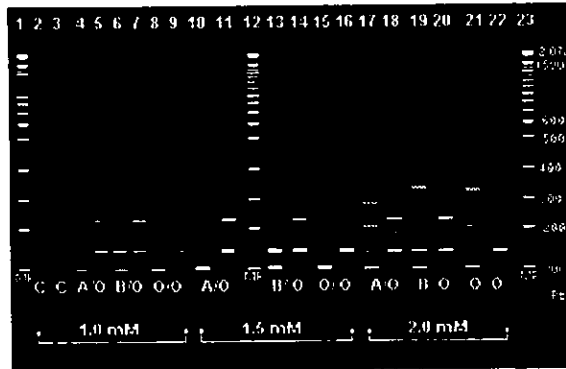


FIGURA 17.- Efecto de la concentración de cloruro de magnesio en la amplificación del locus AaBb. En los carriles 1, 12 y 23 se observa el corrimiento del marcador de peso molécula de 100pb. En los carriles 2 y 3 se muestra el corrimiento de los blancos de reacción para el Dúplex 1 y 2 respectivamente. Del carril 4 al 9 se visualiza el corrimiento de las muestras (A/O, B/O Y O/O) amplificadas utilizándose 1mM de cloruro de magnesio. Del carril 10 al 16 se observa el corrimiento de las amplificaciones con 1.5mM de cloruro de magnesio y por ultimo en los carriles del 17 al 22 se presenta el corrimiento de las amplificaciones en las que se utilizó 2mM de cloruro.

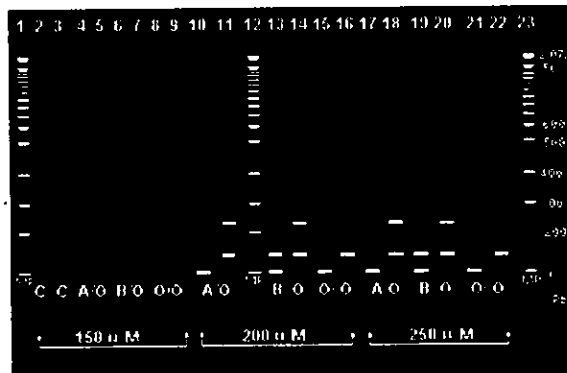


FIGURA 18.- Efecto de la concentración de dNTPs en la amplificación del locus AaBb. En los carriles 1, 12 y 23 se observa el corrimiento del marcador de peso molécula de 100pb. En los carriles 2 y 3 se muestra el corrimiento de los blancos de reacción para el Dúplex 1 y 2 respectivamente. Del carril 4 al 9 se presenta el corrimiento de las muestras (A/O, B/O Y O/O) amplificadas utilizándose 150μM de dNTPs. Del carril 10 al 16 se observa el corrimiento de las amplificaciones con 200μM de dNTPs y por ultimo en los carriles del 17 al 22 se percibe el corrimiento de las muestras amplificadas en las que se utilizó 250μM de dNTPs.

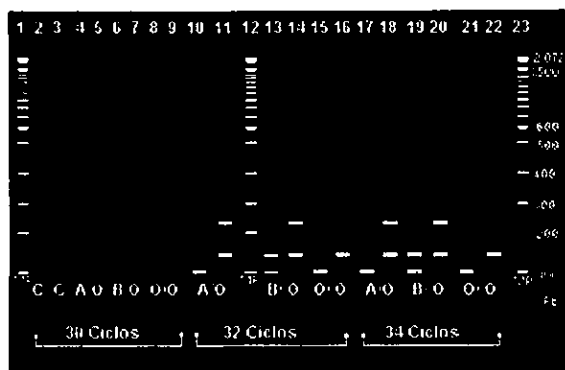


FIGURA 19.- Optimización del número de ciclos para la amplificación del locus AaBb. Los carriles 1, 12 y 23 muestran el corrimiento del marcador de peso molécula de 100pb. En los carriles 2 y 3 se observa el corrimiento de los blancos de reacción para el Dúplex 1 y 2 respectivamente. Del carril 4 al 9 se presenta el corrimiento de las muestras (A/O, B/O Y O/O) amplificadas con 30 ciclos, del carril 10 al 16 se observa el corrimiento de las amplificaciones con 32 ciclos y por ultimo en los carriles del 17 al 22 se percibe el corrimiento de las muestras amplificadas en las que se utilizaron 34 ciclos.

Las concentraciones de cada uno de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa que permitieron su optimización, para la determinación del locus AaBb en los dos Dúplex utilizados se presentan resumidas en el cuadro 2

CUADRO 2

REACTIVOS PARA EL DÚPLEX 1	REACTIVOS PARA EL DÚPLEX 2	VOLUMEN (µl)	CONCENTRACIÓN EN LA REACCIÓN.	CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK
5'Op	5'A/ Bp	7.4	17.12 pM	80000 pM
3'Op	3'A/ Bp	7.6	17.96 pM	80000 pM
5'Bp	5'A/ Op	7.0	26.25 pM	100000 pM
3'Bp	3'A/ Op	7.5	25.56 pM	100000 pM
Buffer 10X RCP	Buffer 10X RCP	5.0	50mM	10X
Taq polimerasa	Taq polimerasa	0.5	2.5U	5U/µl
Mg Cl ₂	Mg Cl ₂	1.5	1.5 mM	50 mM
dNTP	dNTP	2.5	4 mM	200 µM
(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	30 mM	150 mM
BSA	BSA	7.0	8 µg	1.1 mg/ml

Cada muestra tiene dos productos de amplificación, una formada por el Dúplex 1 y otra el Dúplex 2. Los oligos 5'Op, 3'Op, 5'Bp y 3'Bp son utilizados en la amplificación del Dúplex 1 mientras que los oligos 5'A/Op, 3'A/Op, 5'A/Bp y 3'A/Bp lo son para el Dúplex 2.

Sensibilidad.

Con las condiciones optimas determinadas para llevar a cabo la PCR se evaluó la concentración mínima y máxima de ADN que podría ser amplificada para un volumen final de 60µl de reacción. Por lo que de las tres muestras antes elegidas solo se utilizo la correspondiente al grupo O (figura 20)

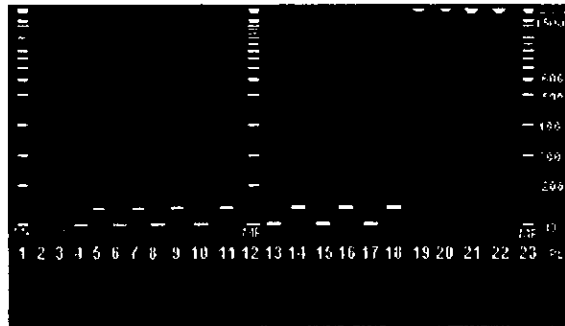


FIGURA 20.- Cantidad de ADN que puede ser amplificada por la técnica PCR. En los carriles 2 y 3 se observa el corrimiento de las muestras (O/O) amplificadas con 1ng de ADN correspondientes al dúplex 1 y 2 respectivamente. Los carriles 4 y 5 se presenta el corrimiento de las muestras (O/O) amplificadas con 2ng de ADN. En los carriles 6 y 7 se observa el corrimiento de las ampliificaciones con 6ng de ADN. Los carriles 8 y 9 muestran el corrimiento de las ampliificaciones con 10ng de ADN. Los carriles 11 y 12 presentan el corrimiento de las ampliificaciones con 14ng de ADN. En los carriles 13 y 14 se visualiza el corrimiento de las ampliificaciones con 18ng de ADN. En los carriles 15y 16 se observa el corrimiento de las ampliificaciones con 22ng de ADN. LOS carriles 17 y 18 muestran el corrimiento de las ampliificaciones con 25ng de ADN. En los carriles 19 y 20 se presenta el corrimiento de las ampliificaciones con 26ng de ADN. En los carriles 21 y 22 se presenta el corrimiento de los blancos de reacción correspondientes al dúplex 1 y 2 respectivamente. y finalmente en los carriles 1, 12 y 23 se muestra el corrimiento de los marcadores de peso molecular 100pb.

b).- CONFIABILIDAD DE LA TÉCNICA PCR EN COMPARACIÓN CON LA TÉCNICA SEROLÓGICA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO DEL SISTEMA ABO.

Amplificación de los genotipos sanguíneos ABO.

La técnica de PCR permitió identificar claramente los diferentes genotipos (A/A, B/B, O/O, A/O, B/O y A/B), del sistema sanguíneo ABO mediante la visualización e interpretación de las bandas características de cada uno de estos genotipos (figura 21).

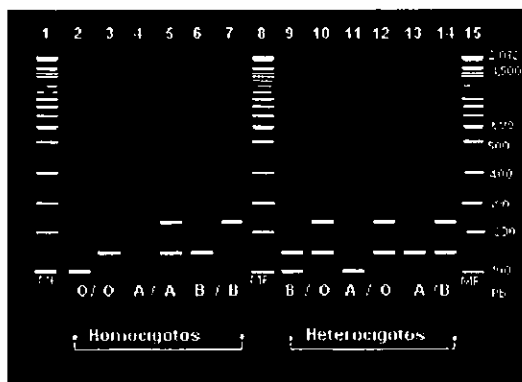


FIGURA 21.- Corrimiento de los genotipos ABO. En el dúplex 1 el alelo 0 en la electroforesis se determina a la altura de 100pb. El alelo B se manifiesta por la presencia de una banda de 147pb. En el dúplex 2 los alelos A o O se presentan a la altura de 147pb. Mientras que los alelos A o B se manifiestan a la altura de 210pb. En el carril 1,8 y 15 se presenta el corrimiento del marcador de peso molecular de 100pb utilizado para la interpretación de los genotipos. En los carril 2 y 3 se distingue el genotipo O/O, en los carril 4 y 5 se percibe el genotipo A/A, en los carriles 6 y 7 se muestra el genotipo B/B, en los carriles 9 y 10 se observa el genotipo B/O, en los carriles 11 y 12 se advierte el genotipo A/O finalmente en los carriles 13 y 14 se visualiza el genotipo A/B/.

Así mientras que sólo a 206 muestras se les determino el grupo sanguíneo ABO por medio de la técnica serológica (fenotipo), la técnica de PCR permitió determinar el grupo sanguíneo (genotipo) a las 210 muestras analizadas. (cuadro 2).

CUADRO 2.

NÚMERO DE MUESTRAS	FENOTIPO DETERMINADO POR SEROLOGÍA	GENOTIPO DETERMINADO POR PCR
119 Sanguíneas	O	O/O
17 Sanguíneas	A	A/A
11 Sanguíneas	B	B/B
28 Sanguíneas	A	A/O
21 Sanguíneas	B	B/O
4 Sanguíneas	A/B	A/B
2 Saliva	O	O/O
1 Saliva	A	A/O
3 Semen	A	A/O
1 Medula	.*	B/O
1 Medula	.*	A/B
2 piel	.*	O/O

.* A estas cuatro muestras no se les pudo determinar el fenotipo por la técnica serológica.

La técnica serológica reportó que de las 210 muestras analizadas 121 presentaron el fenotipo sanguíneo O y 2 fenotipos sanguíneos O no pudieron ser determinados por esta técnica. De igual forma para el grupo sanguíneo se determinaron 4 muestras con fenotipos sanguíneos A/B y 1 fenotipo A/B no pudo ser determinado por esta técnica.

Estos resultados fueron asignados con un 100% de sensibilidad y especificidad debido a que en este caso esta técnica sería utilizada como referencia para evaluar la confiabilidad de la técnica de PCR para la determinación de grupo sanguíneo del sistema ABO.

Con base en el diseño estadístico aplicado se tiene que:

$$S = P (+/GS) = 121/122 = 0.991$$

$$E = P (-/NGS) = 87/88 = 0.98$$

Es decir que la técnica de PCR tiene la capacidad de determinar el grupo sanguíneo de una determinada muestra biológica con una sensibilidad (S) del 0.991 y una especificidad (E) del 0.98.

Así también se tiene que:

$$VPP = 121/123 = 0.998$$

$$VPN = 86/87 = 0.988$$

El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, es decir la probabilidad de que la muestra realmente presente determinado grupo sanguíneo o no lo presente fue del 0.99.8 y 0.988 respectivamente (cuadro 3).

CUADRO 3
PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

MÉTODO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN	CONFIABILIDAD DE LA TÉCNICA
TÉCNICA SEROLÓGICA	98	97	98	98	98%
TÉCNICA PCR	99	98	99	98	99.8%

Donde VPP Y VPN son el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo respectivamente.

c). FRECUENCIA DE LOS GENOTIPOS SANGUÍNEOS ABO DETERMINADAS POR LA PCR

En el estudio realizado se pudieron determinar los diferentes genotipos para el sistema sanguíneo ABO de manera directa de las muestras biológicas tales como tejidos, saliva, semen, hueso etc.

El genotipo homocigoto con mayor frecuencia fue el O/O, representando el 58.57% de las muestras analizadas, es decir que de las 200 solo 123 correspondieron a este grupo (119 de muestras sanguíneas, 2 de saliva y 2 de tejido).

En segundo término se presentó el genotipo heterocigoto A/O, representando el 15.23% de las muestras analizadas, solo 32 correspondieron a este grupo (28 de sangre, 1 de saliva y 3 de semen).

El genotipo heterocigoto B/O se presento en un 10.47% en muestras, con 22 muestras de este grupo (21 de sangre y 1 de tejido).

El genotipo homocigoto A/A, se presento con una frecuencia del 8.1% en el total de las muestras, solo 17 correspondieron a este grupo (17 de sangre).

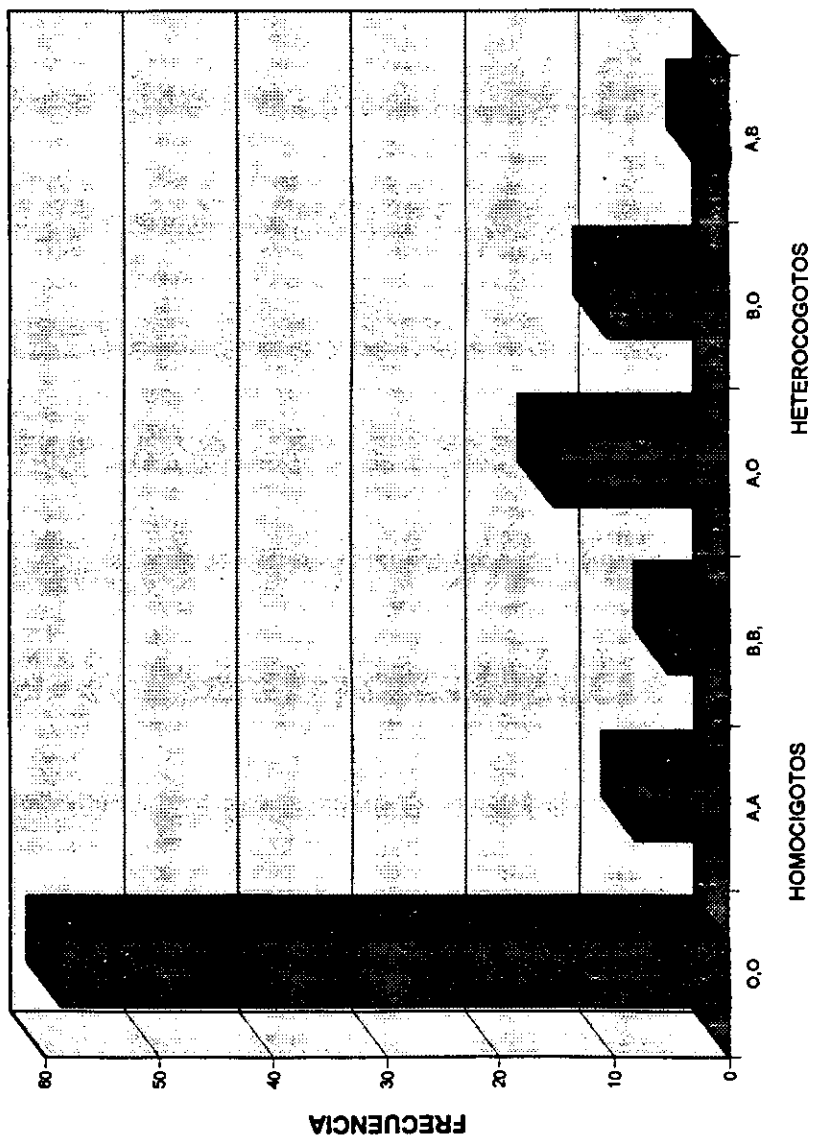
El genotipo homocigoto B/B se presentó con una frecuencia del 5.23% del total de las muestras estudiadas, sólo 11 fueron de este grupo (las 11 de sangre)

El genotipo heterocigoto A/B con una frecuencia del 2.38%, del total de las muestras analizadas 5 presentaron este grupo (4 de sangre y 1 de tejido) cuadro 4 y grafica 1.

Con estas frecuencia el poder de discriminación, es decir la probabilidad de que dos individuos tomados al azar puedan poseer genotipos diferentes para el locus ABO, fue de 0.62.

CUADRO 4.
FRECUENCIAS GENOTIPICAS DEL LOCUS ABO EN 210 INDIVIDUOS
OPTENIDAS POR PCR.

	GENOTIPOS	NUMERO OBSERVADO	FRECUENCIAS GENOTIPICAS RELATIVAS
H O M O C Y G O T O S	O/O	123	58.571
	A/A	17	8.100
	B/B	11	5.238
H E T E R O C I G O T O S	A/O	32	15.238
	B/O	22	10.476
	A/B	5	2.38
	TOTAL	210	100



GRAFICA 2.- Distribución de las frecuencias genotípicas del locus ABO, obtenidas por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, en 210 muestras analizadas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Con base en los resultados obtenidos, la técnica de PCR para la determinación del locus ABO puede ser aplicada a todos los ADNs aislados de diferentes muestras biológicas, que se trabajaron en el laboratorio de genética forense de la PGJDF, siendo hincapié en muestras de sangre, tejido muscular y óseo, saliva y semen, que fueron las que se trabajaron.

Para lo cual fue necesario optimizar las condiciones de reacción para la amplificación de las muestras en estudio, tanto para el dúplex 1 que es específico para el alelo O y B, como para el dúplex 2 específico para los tres alelos A, B y O puesto que ambos son indispensables para la de terminación de un genotipo cualquiera.

Se eligieron tres muestras sanguíneas cuyos grupos sanguíneos correspondían A/O, B/O y O/O, con la finalidad de comprobar si las condiciones de reacción analizadas tenían el mismo efecto (rendimiento) para los diferentes genotipos sanguíneos en estudio.

Para realizar la electroforesis se decidió utilizar el gel de poliacrilamida debido a que permite resolver claramente las bandas de amplificación del locus ABO, siendo factible diferenciar los polimorfismos de esta región, cosa que no sucede con el gel de agarosa en donde no es posible observar la diferencia que existe entre cada una de las bandas obtenidas para cada genotipo.

Con el fin de determinar los genotipos de cada muestra, se utilizó un marcador de peso molecular "Ladder de 100pb" el cual presenta 15 bandas que van de 100 en 100pb hasta 2,072pb. Se eligió este marcador debido a que permite diferenciar claramente los productos de amplificación; así por ejemplo el alelo O en la electroforesis se determina a la altura de 100pb, el alelo B se manifiesta por la presencia de una banda de 147pb o de 216pb, según el dúplex utilizado y el alelo A se presenta a la altura de 216pb. El amortiguador de carga utilizado fue el azul de bromofenol ya que no coincide electroforéticamente con los fragmentos ABO-amplificados.

Para estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, primeramente se vario la concentración de la Taq polimerasa, de una concentración de 2 U hasta 3 U, observándose que cuando la concentración fue de 2 U/60µl no hubo producto de amplificación, esto se presento debido a que esta concentración no fue suficiente para unir los dNTPs al cebador y como consecuencia se evito la formación y polimerización de nuevas cadenas de ADN. Mientras que cuando la concentración de Taq polimerasa fue de 3 U/60µl, si hubo productos de amplificación, pero se observaron una serie de bandas de naturaleza inespecifica, quizá debido a que la enzima incorporo los dNTPs de manera errónea favoreciendo las extensiones o polimerizaciones equivocadas entre los cebadores. Por lo que la concentración que permitió resolver claramente las bandas correspondientes a cada alelo del sistema sanguíneo ABO fue de 2.5 U/60µl (ver figura 16).

En cuanto a la concentración de cloruro de magnesio, cuando esta fue de 1mM/60µl el rendimiento de los productos obtenidos fue muy bajo posiblemente porque la cantidad de magnesio libre disponible para la enzima no fue suficiente para que esta presentara su máxima actividad, ya que aparentemente los dNTPs determinan la cantidad de magnesio libre puesto que estos se unen en forma cuantitativa al ion Mg₂ por lo que la concentración de este ion debe ser mayor a la de los dNTPs. Cuando la concentración de cloruro de magnesio fue de 2mM/60µl los productos obtenidos presentaron bandas inespecificas posiblemente producto de los errores de incorporación de los dNTPs al cebador. Así la concentración optima de cloruro para identificar claramente cada uno de los alelos presentes en el sistema sanguíneo ABO es de 1.5mM/60µl (ver figura 17) .

Otro componente de la reacción que se evaluó fue la concentración de dNTPs cuando esta concentración fue de 150mM/60µl la amplificación no tuvo lugar posiblemente porque esta cantidad no era suficiente para extender los cebadores y dar el producto deseado. Cuando la concentración de dNTPs se encontró en 250mM/60µl el rendimiento de los productos amplificados fue similar al rendimiento obtenido con 200mM/60µl, por lo que para minimizar errores de unión del cebador y reducir la posibilidad de extender los nucleótidos mal incorporados se decidió elegir como concentración optima para la PCR de 200mM/60µl (ver figura 18) .

La concentración de la albúmina sérica bovina y sulfato de amonio que permitió resolver claramente las bandas que corresponden a cada uno de los alelo que conforman el sistema sanguíneo ABO fueron 8µg/60µ y 30mM/60µ respectivamente.

Finalmente un parámetro importante para obtener resultados óptimos de amplificación es el número de ciclos, cada ciclo formado por las siguientes temperaturas.,

PRECALENTAMIENTO	32 CICLOS		TEMPERATURA FINAL	
94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
30 segundos	59 segundos	69 segundos	48 segundos	10 minutos

Priemramente las mezclas de reacción fueron sometidas a 30 ciclos de reacción, no se dio la amplificación, posiblemente porque no fueron suficientes para completar los productos deseados apartir de la concentración de ADN muestra adicionado a la mezcla de reacción.

Por el contrario cuando el número de ciclos fue de 34 el rendimiento de los productos obtenidos fue similar al rendimiento obtenido con 32 ciclos posiblemente porque con este número de ciclos la RCP ya se encuentra en el efecto "plateau", por lo que el número de ciclos elegidos como optimas para esta reacción fue de 32, puesto que aunque el número de ciclos sea aumentado el rendimiento será el mismo y de esta manera se asegura también la especificidad de la reacción ya que un número muy alto de ciclos podría aumenta la cantidad y complejidad de productos inespecificos de fondo l (ver figura 19).

Usándose las condiciones óptimas para la amplificación de locus ABO por PCR se determinó la sensibilidad de la técnica, es decir la cantidad de ADN que podía ser amplificada por esta. Para lo cual se decidió utilizar una muestra cuyo grupo sanguíneo fue O, puesto que de esta manera también se evaluaría la especificidad de la PCR. Encontrándose que cuando la cantidad de ADN es de 1ng no se obtiene ningún producto, debido a que esta cantidad es insuficiente para que se puedan formar los productos deseados apartir de cada uno de los componentes de las mezclas de reacción. Mientras que cuando la concentración de ADN de la muestra es aumentada en un rango de 2ng hasta 25ng el rendimiento del producto obtenido aumenta también gradualmente con la concentración del ADN, este comportamiento se observó tanto en el dúplex 1 como en el dúplex 2. Cuando la concentración de AND. fue mayor a los 25ng la amplificación fue inhibida, posiblemente porque la cantidad de cebadores, dNTPS, enzima y magnesio no fue suficiente para formar las copias de la región deseada apartir de una cantidad tan grande de ADN muestra (ver figura 20).

Optimizar las condiciones de reacción, así como determinar la sensibilidad de la PCR fueron los puntos esenciales para poder distinguir los diferentes genotipos reportados para el sistema sanguíneo ABO. Así de las 49 muestras cuyo grupo sanguíneo determinado serológicamente fue A, solo 17 muestras presentaron el genotipo A/A, dando como producto de amplificación en el dúplex 2 un fragmento de 147pb y otro de 216pb, debido a que el dúplex 1 es específico para el alelo O y B.

Mientras que de las 33 muestras con fenotipo B obtenido por aerología solo 11 muestras presentaron el genotipo B/B, donde se obtuvieron dos producto de amplificación uno para cada dúplex, un fragmento de 147pb y otro de 216pb. respectivamente.

Para el grupo sanguíneo O a 121 muestras se les determinó este grupo mediante la técnica serológica, mientras que a dos muestras fue imposible determinarles su grupo sanguíneo por esta técnica, sin embargo con la utilización de la PCR se determinaron 123 muestras con genotipo O/O, las cuales fueron identificadas al obtenerse producto en ambos dúplex un fragmento de 100pb correspondiente al dúplex 1 y otro fragmento de 147pb correspondiente al dúplex 2.

De las 33 muestras cuyo fenotipo obtenido de manera serológica fue B únicamente 22 presentaron el genotipo B/O, manifestándose por la amplificación en ambos dúplex un fragmento de 100pb y otro de 147 para el dúplex 1 mientras que para el dúplex 2 los fragmentos obtenidos son de 147pb y 216pb.

Otro genotipo identificado fue el A/O en 32 muestras de las 49 que presentaron fenotipo A por la técnica serológica. En la PCR este genotipo se manifestó por la amplificación en el dúplex 1 de un fragmento de 100pb y dos fragmentos uno de 147pb y otro de 216pb en el dúplex 2.

Finalmente 4 muestras a las que se les determino el grupo sanguíneo por aerología presentaron el fenotipo A/B siendo imposible determinarle el grupo a una muestra por esta técnica. Sin embargo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa se determinaron 5 muestras con genotipo A/B, el cual se manifiesta por la amplificación en ambos dúplex en el primero se obtiene un fragmento de 147pb, en el segundo se obtienen dos fragmentos uno de 147pb y otro de 216pb.

Manifestandose claramente que cuando la muestra presente un genotipo homocigoto sólo se observaran en el gel de electorforesis dos bandas como productos de amplificación, mientras que si la muestra presenta genotipo heterocigoto se observaran de tres a 4 bandas como resultado de la amplificación por PCR, esto es por que cada alelo esta representado por dos bandas (ver figura 21).

De acuerdo a los resultados genéticos de grupo sanguíneo que se determinaron por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa,

La técnica de PCR se propone como una alternativa a la clásica tipificación serológica del grupo sanguíneo ABO en muestras de tipo forense debido a que de las 210 muestras procesadas únicamente a 206 se les pudo determinar el grupo sanguíneo de manera serológica como se observa en el cuadro 2.

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica PCR, se utilizo la técnica serológica como referencia por ser la de mayor uso en el área forense, para lo cual se eligieron las muestras cuyos grupos sanguíneos fueron AB y O, en virtud de que el genotipo será el mismo, ya que los alelos A y B son codominantes y siempre se manifestaran fenotípicamente cuando ambos esten presentes, mientras que el fenotipo O solo se manifestara cuando el alelo este en su forma homocigota por ser recesivo.

Así la sensibilidad (99.8) y especificidad (98.8%) obtenidas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO en muestras de tipo forense fueron mayores a las establecidas para la técnica serológica, debido a que esta técnica no permite determinar el grupo sanguíneo ABO en muestras tales como tejidos, médula hueso, donde sólo puede hacerse através del material genético (ADN) cuadro 3.

Como se observa con los resultados obtenidos existe una considerable ventaja al aplicar la metodología para determinar el grupo sanguíneo del sistema ABO sobre la técnica rutinaria serológica. Por medio de la técnica PCR se logra determinar los dos alelos que presenta la persona además de que se logra obtener este grupo en cualquier tipo de muestra biológica, permitiendo determinar la frecuencia de los genotipos ABO como sigue:

GENOTIPO	FRECUECNCIA
O/O	58.57
A/O	15.23
B/O	10.47
A/A	8.10
B/B	5.23
A/B	2.38

El poder de discriminación cuyo valor fue de 0.62 indica que el poder de individualización no es muy grande por lo tanto una proporción considerable de la población puede ser excluida, por lo que determinar el grupo sanguíneo de manera genética es una herramienta útil para el trabajo forense siempre y cuando se complete con el empleo del estudio de otros genes.

CONCLUSIONES

El sistema sanguíneo ABO ha tenido y tiene aplicación en el campo de la identificación, pues si bien es cierto que no permite un diagnóstico individual afirmativo no es menos cierto, que a través de los grupos sanguíneos ABO, es posible eliminar a determinadas personas involucradas en ilícitos penales o atribuirles cierto parentesco.

Considerando los problemas a los que se enfrenta el área forense para poder determinar el grupo sanguíneo ABO de las muestras sanguíneas involucradas en un hecho delictivo, toda vez que entre los indicios que frecuentemente se producen durante la comisión de diversos delitos (robo, aviación asesinato etc.), las manchas de sangre ocupan un lugar predominante sin embargo en la mayoría de estos sólo se cuenta con cantidades sumamente pequeñas y de muy mala calidad que hacen imposible el estudio serológico, impidiendo con ello apartar datos importantes para el esclarecimiento de las investigaciones realizadas.

Se propone la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa como alternativa de tipificación del grupo sanguíneo del sistema ABO para determinar de manera rápida, sensible y confiable el grupo sanguíneo del sistema ABO, a partir de pequeñas cantidades de muestra sanguínea, así como de cualquier tipo de muestra biológica involucrada.

Por lo antes expuesto se estandarizó la técnica de PCR para la determinación del locus ABO, para poder ser implementada como prueba de rutina en el laboratorio de genética forense de la PGJDF, estableciéndose las siguientes conclusiones puntuales.

La concentración óptima de Taq polimerasa para la amplificación fue de 2.5U ya que si esta se encuentra por abajo no se obtienen los productos de amplificación mientras que si esta por arriba se acumulan los productos inespecíficos.

La concentración óptima de cloruro de magnesio para la amplificación fue de 1.5mM, si esta es menor el rendimiento de los productos amplificados es muy bajo, mientras que si la concentración de cloruros es mayor se obtienen productos inespecíficos.

La concentración de dNTPS que optimiza la reacción fue de 200 μ M, puesto que a menor concentración la amplificación no tiene lugar, mientras que por arriba de esta concentración el rendimiento de los productos obtenidos es igual al obtenido con los 200 μ M.

El número de ciclos óptimos para obtener los productos deseados fue de 32 ya que por abajo de este número de ciclos la amplificación no tiene lugar mientras que por arriba de este número el rendimiento de los productos obtenidos es igual al que se obtiene con 32 ciclos.

La cantidad mínima de ADN que se requiere para obtener resultados confiables fue de 2ng por muestra en un volumen final de 60µl, lo que la hace sumamente útil para la tipificación de muestras forenses donde frecuentemente la cantidad de material encontrado como evidencia disponible para el análisis es muy pequeña e irremplazable.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa permitió la tipificación de todos los genotipos posibles del sistema sanguíneo ABO. entre los que se incluyen A/A, B/B, O/O, A/O, B/O, y A/B, a partir de cualquier tipo de muestra biológica.

La técnica de PCR para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO brindo una confiabilidad (99.8%) mayor que la de la técnica serológica (98%), es relativamente rápida y permitió tipificar el grupo sanguíneo en muestras tales como tejido, medula etc., lo cual no es posible realizarlo con la técnica de serológica.

Las frecuencias alélicas encontradas en la población analizada con la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa no se vieron modificadas a las obtenidas por la técnica serológica.

El poder de discriminación para grupo sanguíneo ABO, obtenido por PCR fue mayor al establecido para la tipificación de grupo sanguíneo por la técnica serológica

Para los propósitos Criminalísticos, el tipo y naturaleza de las muestras juegan un papel trascendental, ya que estas se pueden encontrar en buen estado o parcialmente en descomposición, por lo que con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa se trabajo con muestras que contaban con antigüedad que de manera serológica no se les puede determinar el grupo sanguíneo ABO, trabajándose también con muestras tales como tejido, hueso, muestras que con frecuencia se les tiene que determinar el grupo sanguíneo como otro marcador que permita la clara identificación de un individuo dado, y como reporta con la PCR si se logro determinar el grupo sanguíneo de cualquier tipo de muestra biológica de origen humano, por tal razón es recomendable aplicar esta técnica en áreas criminalísticas donde se requiere los datos de grupo sanguíneo ABO, que aunados a otros genotipos de diferentes genes, se presenta conformando un buen sistema de identificación.

Por lo que la utilidad de esta prueba se verá reflejada en el análisis criminalístico del sistema de identificación por ADN logrando que la impartición de justicia se profesionalice, y garantice la obtención de resultados confiables que en beneficio de la sociedad se traduzcan desde reintegrar a un menor a sus padres en caso de robo de infante, entregar el cadáver irreconocible de un ser querido (padre, madre, hijo) a sus familiares, concluir la presencia de un sospechoso en el lugar de los hechos y su participación en el hecho delictivo o retirar de las calles a un violador, entre otros.

La tipificación del ADN con propósitos de identificación legal y forense, requiere indiscutiblemente de profesionales como químicos, biólogos etc., conscientes del valor de la ética profesional y moral par poder servir a la sociedad de la que forman parte.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Rolfs A.; Schuller Y.; Finckh U. PCR Clinical diagnostics and research. New York: Springer-Verlag, 1992: 1-28.
- 2.- Stryer L. Bioquímica: 3a ed. España: Reverté. 1990: 71-83, 117-141, 671-692..
- 3.- Sittman D. Recombinant DNA in biochemistry. Harwald Publishing. 1994: 231-249.
- 4.- Lehninger A.L. Bioquímica. 2a ed. New York; Worth Publisher Inc. 1975: 891-908.
- 5.- Darnell J.; Lodish H.; y Baltimore D. DNA Replication, Repair and Recombination In Molecular Cell Biology. 4a ed. Scientific American Books, 1990: 447-467.
- 6.- Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J.D. Molecular Biology of the Cell. 2a ed. Garland Publishing Inc. 1989: 269-270.
- 7.- Watson J.D.; Hopkins N.H. Molecular Biology of de Genes. 4a de. Benjamin Cummings Publishing Co. 1987: 282-310.
- 8.- Delpch M. PCR Un nuevo Instrumento para el Diagnóstico Médico. Mundo Científico. 1993: 13; 174-180.
- 9.- Mullis K.B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction Scientific American. 1990: Abril; 56-65.
- 10.- Ronert P.; Wagner M.; Marjorie P. M. Monroe W. Chromosomes a Synthesis. U.S.A: Wiley -Liss. 1993: 414-418.
- 11.- Pellon R.J. La Ingeniería Genética y sus Aplicaciones. España: Acribia. 1995: 13-16,
- 12.- Reynolds R.; Sensabaugh G.; Blake E. Analisis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples using the Polymerase Chain Reaction. Analytical Chemistry. 1991: 63; 2-15.
- 13.- Chakraborty R.; Kidd K. The utility of DNA Typing in Forensic Work. Science 1991: 254; 1735-1739.
- 14.- Robertson; Ross A.; Bugoyne I. DNA in Forensic Science Techniques and Application. Ellis Hood imited, 1990.

- 15.- Frégeau C.J. y Fournery R M. DNA Typing with Flourescently Tagged Short Tandem Repeats: A Sensitive and Accurate Approach to Human Identification. *Biotechniques*, 1993: 1; 100-119.
- 16.- Von Beroldingen C H.; Blake E T. Application of PCR to the Analysis of Biological Evidence in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application. Academic Press Inc. 1990: 209-223.
- 17.- Perkin Elmer. HLA DQalfa PCR-Based System Validated for Forensic Casework. Amplifications. A Forum for PCR User s Issue. 1993: 11; 14-15.
- 18.- Higuchi R.; von Beroldingen c H. DNA Typing from Single Hairs *Nature*. 1988: 332:: 543-546.
- 19.- Perkin Elmer. New AmpliFLP D1S80 DNA Typing for Forensic Analysis and Bone Marrow Typing Research Amplifications. A Forum for PCR Users. Issue. 1993: 11; 15.
- 20.- Holland M M.; Fisher D Y. Short Tandem Repeat loci; Application to Forensic and Human Remains Identification, EXS Suiza. 1993: 67; 267-274.
- 21.- Know S.; Sninsky J J. In *PCR Technology: Principles and applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press: 1989: 62: 235-244.
- 22.- Syvänen A C.; Sajantila A. Forensic DNA Typing by the Solid Phase Minisequencing Method EXS Suiza. 1993: 67; 275-280.
- 23.- Harmening D. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*, 2a de. Philadelphia: F. A. Davis Company. 1989: 78-83.
- 24.-Turgeon M L. *fundamentals of Immunohematology*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1989: 95-125.
- 25.- Stites p D.; Terr I A. *Inmunologia Básica y Clínica*. México d. F.: El manual moderno 1993.
- 26.-Erskine, W W.; Socha. *Principales and Practice of Blood Grouping*. 2a de. E. U. A.: The C. U. Mosby Company 1988: 55-90.
- 27.- Hakomori S. Blood Grups ABH and of human erythrocyte. *Chemistry, Polimorphism and their developmental change*. *Senun Hematol*. 1991: 39 18-20.
- 28.- Watkins W.M. *Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and B blood group systems*, in *advances in human genetics*. Plenum press 1980: 52; 25-30

- 29.- Yamamoto F H.; Clausen T.; White J.; Markin and Hakamori S. Molecular Genetic Basic of the Histo Blood Group ABO System. Batue 1990: 345; 229-233.
- 30.- Fukumori Y.; Ohnoki S.; Shibata H.; Nishimuka H. Suballeles of the ABO Blood Group System in a Jaoanese Population. Human Heredity 1996: 46; 85-91.
- 31.- Kushi Y.; Tsunoda A.; Komatsuzaki A.; Watanabe K.; Kasama T.; Handa S. Characterization of Blood Grup ABO Active Glycosphingolipids in type AB human erythrocytes. Eur J Biochem. 1995: 3; 862-867.
- 32.-Herrin J. A Simplification Procedure for Two Regions of the Glycosyl Transferase (ABO Blood Group) gene. Journal of Forensic Science. 1996: 41; 138-141.
- 33.-Racer R R.; Sanger Ruth. los Grupos Sanguineos Humanos. 2a ed. México: La Prensa Médica. 1975: 8-17.
- 34.-Levine L.; and Lawrence K. reliability Versus validity if Test Used in Genetic Identification. New York: Social Biology. 1995: 42; 274-275.
- 35.- Watkins W.M. Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and B blood group systems, in advances in human genetics. Plenun press 1981: 60; 15-20
- 36.- Kopec M.; Donantewska. The Distribution of the human Blood Group adn other polimorphisms. 2a ed. E. A. U.: Oxford 1989: 271-275.
- 37.-Erskine A. G.; Sicha W W. The Principles and Practice of Blood Grouping. ea ed. The C. V. Mosby company E.U.A. 1992: 82-91.
- 38.- Aguilar M R. Inmunohematología Aplicada al Banco de Sangre.2a ed. Sociedad de Mexicana de Hematología. 1989: 58-69.
- 39.- Gell P. G. H.; Sacha W W.; Lachmann P J. Clinica Inmunológica . 2a ed. México: Salvat. 1990: 132-243.
- 40.- Franco A. M. Hematología Forense. 2a ed. México: Porrúa S. A. 1991: 49-71.
- 41.-Ssaki M. and Hiroshi Shiono M D. ABO Genotyping of Suspects Sperm DNA Isolated from Postcoital Samples in Sex Crimes. Journal of Forensic Sciences 1996: 41; 275-278.
- 42.-Ladd C.; Michael T B.; Carol A.; Scherezinger.; Elaine M .; Plagiario M S. A PCR Based Strategy for ABO Genotype determination. Journal of Forensic Sciences. 1996: 41; 134-137.

- 43.- Malcolm L.; Beck F I ;Alan D.; Yates B A.; Hardman M A.; and Kowalski B S. Identification of a subset of Group B Donors Reactive With Monoclonal Anti A Resagent. *Immunochemical Genetics*. 1989: 92; 625-629.
- 44.- Crouse C.; Vincek V. Identificación of ABO Alleles on Forensic-type Specimens Using rapid -ABO Genotyping. *Biotechniques*. 1995: 18; 478-483.
- 45.- Tun Z.; Honda K., Nakatome M.; Islam M N.; Bai H.; Ogura Y. Rapid and Clear Detection of ABO Genotypes by simultaneous PCR-RFLP Method. *J Forensic Sci*. 1996: 41; 1027-1030.
- 46.- Ram S V; Babu A. *Human Chromosomes, Principles and Thechniques*. 2a ed. Mac Grawa-Hill, Inc. 1995. 312-335.
- 47.-Pääbos S. *Amplifying Ancient DNA in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application*. Editores: Innis M A.; Gelfand D H.; Sninsky J J.; White TJ. E.U.A.: Academic Press Inc 1990: 159-166.
- 48.- White T.J.; Arnheim N.; Erlich H A. The Polymerase Chain Reaction. *Trends in Genetics*, 1989: 6; 185-188.
- 49.- Gelfand D H. Taq Polymerase in PCR Technology. *Principles and Application for DNA Amplification*. Stockton Press- 1990: 17-22.
- 50.- Sardello A D. Plateau Effect-Understanding PCR Limitations Amplifications, A forum for PCR users. *Issue* 1993: 9; 1-7.
- 51.- Persing D H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches, *J Clin Microbiology*. 1991: 7; 1281-1285.
- 52.- Saiki R K. *The Design and Optimization of the PCR Technology. principles and Application*. E.U.A.: Academic Press Inc.1989: 7-16.
- 53.- Sninsky J.; Gelfand D. ULTma DNA Polymerase: The only proofreading enzyme guaranteed for PCR Amplifications. *Amplifications, A forum for PCR users. Issue*. 1993: 11; 12-13.
- 54.-Kunkel T A.; Eckert K A.; Fidelity of DNA Polymerase Used in Polymerase Chain Reaction in Polymerase Chain Reaction. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor lqaboratory Press. 1991: 5-10.
- 55.-Saiki R K: Optimization of the polymerase Chain Reaction in Polymerase Chain Reaction. *Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990: 25-30.

- 56.-innis M A.; Gelfand D H: Optimization of PCRs inPCR protocols. A guide to Methods and Aplication. E.U.A.: Academic Press, Icn.1993: 3-12.
- 57.- Higuchi R. Simple and Rapid Preparation of Samples por PCR in PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification. Stockton Press 1990: 31-38.
- 58.-Cimino G D.; Metchette k C. Posty-PCR Sterilization: a Method to Control Carryover Contamination for the Polimerase Chain Reaction. Nucleic. Acid Research. 1990: 19; 99-107.
- 59.-Gelfand D H. Thermus aquaticus DNA Polymerase in Polymerase Chain Reaction. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990: 11-17.
- 60.- Gelfand D. H.; White T J. Thermostable DNA Polymerases in PCR Protocols. A guide to Methods and Application. E.U.A.: Academic Press, Inc. 1990: 129-141.
- 61.- Aguilar M. R. Inmunohematología Aplicada al Banco de Sangre. Sociedad Mexicana de Hematología. 1985: 12; 25-29.
- 62.- Lisker R.; Ramirez E.; Briceño P. R: and Babinisky V. Gene Frequencies and Admixture Estimates in Four Mexican Urban Centers. Human Biology. 1990: 62; 791-801.
- 63.- Rodriguez E. Determinación de las Frecuencias Fenotípicas de las Poblaciones Indigenas Mexicanas. Ciencia y Desarrollo 1990: 12; 56-89.
- 64.- Berumen C J.; Casa A L.; Hernandez M A; Segura S E.; Medina L R.; Larriva S J. Diversidad Genética de tres sondas de DNA en la huella digital de DNA de una población Mexicana. La revista de Investigación Clínica. 1994: 46; 457-464.
- 65.-Dougles C. M. Design and Analysisi of experiments 3a ed. Arizona State University ; Jhohn Wyley & Sons. 1991
- 66.- Menden H W. Introduction to Probabilyty and Statistics. 7a ed. U.S.A; PWS Poblshers. 1987:

APÉNDICE A

HIDRATACIÓN DE LOS PRIMERS:

Primer 5'Op

Peso de todo el polvo liofilizado=542.316µg

A los 542.316µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 3'Op

Peso de todo el polvo liofilizado=499.212µg

A los 499.212µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 5'Bp

Peso de todo el polvo liofilizado=536.48µg

A los 536.48µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 3'Bp

Peso de todo el polvo liofilizado=447.59µg

A los 447.59µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 5'A/Op

Peso de todo el polvo liofilizado=463.404µg

A los 463.40.316µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 3'A/Op

Peso de todo el polvo liofilizado=444.034µg

A los 444.034µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 5'A/Bp

Peso de todo el polvo liofilizado=481.568µg

A los 481.568.316µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

Primer 3'A/Bp

Peso de todo el polvo liofilizado=416.433µg

A los 416.433µg adicionar 1 ml de H₂O mezclar perfectamente.

APÉNDICE B.

PREPARACIÓN DE LOS OLIGOS PARA LAS REACCIÓN DUPLEX 1 Y DUPLEX 2.

Para determinar el volumen en el cual se disolverá cada oligo use la siguiente formula.

$$\frac{\text{Absorbancia a 260nm}}{((EM) \times \text{concentración molar requerida})} = \text{ml de H}_2\text{O}$$

Donde:

EM= Es el coeficiente de extinción molar y se calcula como sigue: No.de Adeninas (16,000)+No.de Guaninas(12,000)+No.de Citosinas (7,000)+No.de Timinas (9,600).

	No.de Adeninas	No.de.Gauninas	No.de Citocinas	No.de Timinas
Primer 5'Op	4	8	3	5
Primer 3'Op	1	9	3	6
Primer 5'Bp	3	7	6	5
Primer 3'Bp	6	5	6	2

DÚPLEX 1.

Primer 5'Op

Como a todo el polvo liofilizado (542.316µg) se le adicionó 1ml de agua se detrmino la cocnctración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{17.2}{(229000) (1\text{ml})} = 7.5109 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Se requieren 12,5 pM por cada 25µl de reacción para 50µl de reacción se requerirán 25 pM.

Si cada ml equivale a 7.5109×10^{-5} Moles.

Y para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 250 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces:

Para que en 5µl tengan 250pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 75000pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1µl y se llevara a 1500µl con agua esteril.

Primer 3'Op

Como a todo el polvo liofilizado (499.212µg) se le adicionó 1ml de agua se detrmino la cocnetración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{14.7}{(202600) (1\text{ml})} = 7.25567 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Si cada ml equivale a 7.25567×10^{-5} Moles.

Para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 250 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 250pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 75000pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

Primer 5'Bp

Como a todo el polvo liofilizado (536.48µg) se le adicionó 1ml de agua se determinó la concentración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{16.0}{(202000) (1\text{ml})} = 7.20720 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Si cada ml equivale a 7.20720×10^{-5} Moles

Para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 375pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 375pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 112500pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1.6µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

Primer 3'Bp

Como a todo el polvo liofilizado (447.59µg) se le adicionó 1ml de agua se determinó la concentración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{14.3}{(217200) (1\text{ml})} = 6.58379 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Si cada ml equivale a 6.58379×10^{-5} Moles

Para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 375 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 375pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 112500pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1.7µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

DÚPLEX 2.

Primer 5'A/Op

Como a todo el polvo liofilizado (463.404µg) se le adicionó 1ml de agua se determinó la concentración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{13.8}{(222000) (1\text{ml})} = 6.21621 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Si cada ml equivale a 6.21621×10^{-5} Moles

Para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 375 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 375pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 112500pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1.8µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

Primer 3'A/Op

Como a todo el polvo liofilizado (444.034µg) se le adicionó 1ml de agua se determinó la concentración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{14.2}{(214600) (1\text{ml})} = 6.61696 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Si cada ml equivale a 6.61696×10^{-5} Moles

Y para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 375 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 375pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 112500pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1.7µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

Primer 5'A/Bp

Como a todo el polvo liofilizado (481.568µg) se le adicionó 1ml de agua se determinó la concentración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{14.9}{(225000) (1\text{ml})} = 6.62222 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Se requieren 12,5 pM por cada 25µl de reacción para 50µl de reacción se requerirán 25 pM.

Si cada ml equivale a 6.62222×10^{-5} Moles

Y para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 250 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 250pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 75000pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1.1µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

Primer 3'A/Bp

Como a todo el polvo liofilizado (416.433µg) se le adicionó 1ml de agua se determinó la concentración de este utilizando la formula antes escrita.

$$\text{Concentración molar} = \frac{12.7}{(210400) (1\text{ml})} = 6.03612 \times 10^{-5} \text{ Moles.}$$

Si cada ml equivale a 6.03612×10^{-5} Moles.

Para obtener la concentración que se desea del primer en los 50µl se requieren 250 pM tomando un volumen de 5µl de la solución stock.

Entonces :

Para que en 5µl tengan 250pM se requiere partir de una solución cuya concentración sea de 75000pM en 1500µl, por lo que de la solución stock se tomaran 1.2µl y se llevara a 1500µl con agua estéril.

APÉNDICE C

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Agarosa al 0.8%

Pesar 0.8g de agarosa grado electroforesis y adicionar 100ml de TAE 1X, colocar en el horno de microondas hasta que los cristales desaparezcan, agregar agua desionizada par completar el volumen original.

Azul de bromofenol:

Disolver 0.1g de azul de bromofenol en 23.75 ml de H₂O desionizada, agitar y adicionar 1ml de Tris-HCL 1M (pH8), 0.25ml de EDTA 0.5M y 25ml de glicerol, mezclar vigorosamente.

Bromuro de Etidio:

Solución 1000X (0.5mg/ml); adicionar 50mg de bromuro de etidio en 80ml de H₂O. Aforar a 100ml y almacenar a 4 °C protegido de la luz en un recipiente ámbar.

Solución de trabajo: Hacer una dilución de la solución anterior 1:1000 (para tefir los geles).

Buffer TAE:

Disolver 242.2g de Tris Base en 400ml de H₂O destilada, 200ml de EDTA 0.5M y 57.1 ml de ácido acético glacial. Ajustar el pH a 8.0 y aforar a un litro.

Buffer TBE 10X:

A 40ml de 0.5M EDTA, pH 8.0 adicionar aproximadamente 900 ml de H₂O destilada. Adicionar 108 g de Tris base y 55 g de ácido bórico para diluir la solución de EDTA, Agitar vigorosamente con una barra magnética. Ajustar el volumen a un litro con H₂O desionizada. Filtrar la mezcla utilizando un filtro Nalgene de 0.2 a 0.4 µm para remover las partículas sólidas y prevenir la formación de un precipitado. Almacenar en un contenedor de vidrio para facilitar la inspección visual del precipitado. Si se observa un precipitado blanco, el buffer deberá desecharse.

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Se requieren 15mM por cada 25 μL de reacción para 50 μL de reacción se requerirán 30mM.
Concentración deseada 300 mM (0.30 M) en los 50L para obtener una dilución 1:10
Peso molecular $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 132\text{g/mol}$

Si 1M equivale a 132g

0.30M estarán contenidas en 39.6g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Si 39.6g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ están en 1000ml

Para 100ml se requerirán 3.96g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Albúmina sérica bobina BSA

Se requieren 4 μg por cada 25 μL de reacción para 50 μL de reacción se requerirán 8 μg
Si por cada 100ml se tienen 22g de BSA

en 0.5ml se tendrán 0.11g de BSA

Para obtener la concentración deseada realice una dilución 1;100 para lo cual

Si 1 ml contiene 1.1mg de BSA

Los 0.008mg requeridos estarán en 7.27 μL .

Acrilamida al 30 %

En 100 ml de agua desionizada. adicionar:

Acrilamida 29 g.

N.N-Methylenebisacrylamida 0.1 g.

Persulfato de amonio al 10%.

Adicionar a 1ml. de agua desionizada 0.1 g. de persulfato de amonio.

APÉNDICE D

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO ADN.

Extracción de ADN de células espermáticas.

- 1.- En un micro tubo de 1.5ml con 200µl de Chelex al 5% se colocaron 3µl de semen.
- 2.- Se adicionó 2µl de proteinasa K (10mg/ml) y 7µl de DTT 1M, por inversión se mezcló suavemente y se incubó a 56°C de 30 a 60 minutos.
- 3.- Una vez terminado el tiempo de incubación se agitó el tubo con la muestra en el vortex de 5 a 10 segundos a alta velocidad y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 o 10 segundos y se incubó a 100°C por 8 minutos.
- 4.- A continuación se agitó vigorosamente la muestra en el vortex durante 5 a 10 segundos a alta velocidad y se centrifugó de 2 a 3 minutos a 5000 rpm.

NOTA: la muestra ahora esta lista para el proceso de amplificación. Se recomienda utilizar 20µl del sobrenadante para la técnica de PCR y almacenar las muestras de 2 a 8 °C. Para reutilizarse repita el punto 4.

Extracción de ADN de células epiteliales obtenidas de saliva:

- 1.- Se colocaron aproximadamente 2 ml de saliva en un tubo flacón estéril y se adicionó dos veces el volumen de etanol al 96%.
- 2.- Al día siguiente se centrifugó el tubo a 2100 rpm por cinco minutos y decantó el sobrenadante después se adicionó 0.5ml de buffer de digestión, 12µl de proteinasa K (10mg/ml) y 15µl de DTT y se incubó a 56°C por dos horas, durante este lapso se agitó vigorosamente cada 15 o 20 minutos.
- 3.- Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugó a 2100 rpm durante 5 minutos y con mucho cuidado se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo estéril limpio de 1.5ml y se desechó el pellet.

- 4.- Posteriormente se agregó el mismo volumen de etanol absoluto frío al que se obtuvo en la etapa anterior y se invirtió el tubo varias veces a continuación se congeló por 30 minutos.
- 5.- Una vez transcurridos el tiempo de congelación se centrifugó el tubo a 2100rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación sin perder el pellet y se colocó el tubo sobre una superficie absorbente (papel) para quitar el exceso de etanol absoluto.
- 6.- Después se lavó el pellet con 1.5ml etanol al 70% a temperatura ambiente, se centrifugó a 2100 rpm durante 15 minutos y se decantó el etanol.
- 7.- A continuación se colocó la muestra en el hibridizador a 56°C hasta que el etanol se evaporó completamente y se adicionó 200µl de buffer TE pH8.
- 8.- Se dejó que la muestra se disolviera toda la noche a 37°C.

NOTA: La muestra está lista para el proceso de amplificación.

Extracción del ADN de muestras de tejido.

- 1.- El tejido (músculo, médula etc) se seccionó una parte y se lavó perfectamente con agua estéril.
- 2.- Utilizando un tubo frasco estéril se adicionó la fracción del tejido limpio y se agregaron 500µl de buffer de digestión, 50µl de proteinasa K y 50µl de DTT. se incubó a 56°C hasta que el tejido se deshizo.
- 3.- Después de la incubación se centrifugó 5 minutos a 2100 rpm y del sobrenadante se toma 1ml al cual se le adicionó 1ml de fenol-cloroformo para precipitar las proteínas, se agitó con vortex y se centrifugó 5 minutos a 2100.
- 4.- Retirar la fase orgánica y correr un gel de la fase acuosa para cuantificar el ADN.

GLOSARIO

Ácido Desoxirribonucleico: Molécula en forma de doble hélice, portadora de los genes y formas de subunidades nucleotídicas. Contiene toda la información genética de la célula.

Ácido nucleico: Molécula biológica ácida lineal y portadora de información, que pertenece a una de dos familias químicas ADN y ARN.

ADN complementario: ADN cuyas bases son complementarias al ARNm, se emplea para clonación o como sonda específica en estudios de hibridación.

ADN polimerasa: Enzima que puede sintetizar una nueva cadena de ADN, usando como molde una otra cadena de ADN ya existente.

ADN recombinante: Secuencia nueva de ADN, producida por la unión en un laboratorio de porciones de ADN de distintos organismos. Puede introducirse en las células donde puede ser funcional.

Alelo: Una de las dos o más formas alternativas de un gen en un locus determinado, que da lugar a características hereditarias alternativas.

Amplificación de ADN: Es el incremento en el número de copias de un fragmento específico de ADN, puede efectuarse en material *in vitro* o *in vivo*.

Bases: A estas se les denomina también pares de bases, y a cada par lo conforman la unión de Adenina y Timina (o Adenina y Uracilo en el caso de ARN), y Citosina y Guanina.

Biotecnología:

Cualquier tecnología que utilice organismos vivos o partes de organismos para hacer o modificar productos que mejoren las plantas o animales o desarrollen microorganismos para usos específicos.

Carbohidrato:

Son compuestos de fórmula molecular $C_m(H_2O)_n$. Sin embargo, el término carbohidrato se utiliza normalmente en un sentido más limitado para designar polihidroxialdehídos y polihidroxicetonas y sus derivados.

Célula:

Es la unidad básica de la vida en cualquier organismo vivo, capaz de autoreproducirse y constituye el único elemento que proporciona ADN para todo tipo de análisis independientemente del órgano o fluido del que proceda, incluyendo el utilizado en aspectos forenses para identificación.

Centromero:

Región del cromosoma a la que se fijan las cromátidas y las fibras del huso durante la división celular.

Criminalística:

Ciencia penal auxiliar que mediante la aplicación de sus conocimientos, metodología y tecnología al estudio de las evidencias materiales descubre y verifica científicamente un hecho delictivo y al o los presuntos autores aportando las pruebas a los organismos que procuran y administran justicia.

Complejo HLA:

Complejo de antígeno leucocitario en humanos. Ocupa un segmento de ADN de alrededor 3,500 Kb de largo localizado en el brazo corto del cromosoma 6. La región localizada junto al telómero contiene los genes que codifican a la molécula clase I de histocompatibilidad (HLA-B, HLA-C y HLA-A). La región próxima al centromero contiene a los genes que codifican a las moléculas clase II (DP, DQ, y DR). Los genes que codifican a los componentes del sistema del complemento se ubican en la región media del complejo.

Código Genético:

El conjunto de relaciones entre los tripletes de bases nitrogenadas del ARN mensajero y los 20 aminoácidos que forman las unidades básicas de las proteínas.

Codón:

Triplete de bases del ADN que codifica un aminoácido.

Codominancia:

Cuando el par de alelos se expresa en el heterocigoto: Por ejemplo el grupo sanguíneo AB

Cromosoma:

Estructura de la célula portadora de los genes, bajo el microscopio parecen pequeños bastones y están hechos de ADN y proteínas. En las bacterias son cadenas circulares.

Diploide:

Célula que contiene dos juegos completos de cromosomas.

Dominante:

Se refiere a los alelos que manifiestan completamente su fenotipo cuando están presentes en estado heterocigoto. Los alelos cuya expresión fenotípica se enmascaran por los alelos dominantes se denominan alelos recesivos.

Doble hélice:

Configuración de la molécula de ADN. Dos cadenas de nucleótidos se enroscan entre sí para formar la doble hélice, que es la forma de diámetro uniforme que resultaría de envolver dos alambres alrededor de un cilindro.

Electroforesis:

La separación e identificación de moléculas a partir de su movimiento a diferentes velocidades (dependiendo de su carga y tamaño final), generalmente en un gel y a través de un campo eléctricamente cargado. Método de separación de moléculas.

Enzima de restricción:

Enzima que corta las moléculas de ADN en puntos específicos.

Enzima

Sustancia orgánica soluble, que provoca o acelera una reacción bioquímica.

Fenotipo: Las características perceptibles asociadas con un genotipo particular.

Gen: La unidad física y funcional de la herencia, que se transmite de un generación a la siguiente y puede transcribirse en un polipéptido o proteína.

Genética: El estudio de la herencia de características específicas.

Genética molecular: Estudio de las base molecular de la estructura y función de los genes.

Genética de poblaciones: Estudia la distribución de los genes y genotipos de las poblaciones y el modo que la frecuencia de los mismos se conservan o modifican. Trata de explicar en términos cuantitativos y predictivos el proceso de adaptación.

Genoma: La dotación completa de un organismo o individuo.

Genotipo: La constitución genética de un individuo que subyace a un rasgo o constelación de rasgos específicos.

Hardy-Weinberg Ley de: Es una ecuación matemática llamada así en honor a un científico británico y otro alemán que a comienzos de este siglo la desarrollaron para intentar calcular los cambiantes destinos de un gen a través de distintas generaciones. La ecuación utiliza la frecuencias de los alelos alternativos de un gen en una población inicial para calcular sus frecuencias futuras en cada generación posterior. Sin embargo las predicciones solo resultan fiables bajo estricto conjunto de condiciones previas que son: Que el tamaño de la población sea muy grande. que todos los apareamientos se lleven a cabo al azar, que todos los alelos sean codominantes y que no lleguen alelos de fuente externa.

- Haploide:** Célula que contiene sólo un juego (o la mitad del número diploide usual), de cromosomas.
- Heterocigoto:** Cuando ambos alelos en un organismo son diferentes
- Homocigoto:** Cuando los dos alelos en un organismo son del mismo tipo.
- Indicio** Es el material que realmente proporciona información significativa para el curso de una identificación. Por lo que no cualquier material puede ser un indicio .
- Ingeniería genética:** La técnica de alterar la constitución genética de células u organismos individuales mediante inserción, eliminación o alteración deliberadas de genes individuales.
- Iniciador:** Son oligonucleotidos sintéticos cada uno complementario a una secuencia corta en una banda del segmento de ADN deseado y que se sitúa cerca del extremo de la secuencia que se desea amplificar y son utilizados para la replicación de un segmento de ADN invitro.
- Kb:** Kilobase , miles de bases en un fragmento.
- Locus:** Un sitio específico en un cromosoma.
- Marcador genético:** Es una característica simple heredada, la cual es estudiada no sólo por su interés intrínseco, sino para rastrear este segmento sobre un cromosoma. Un rasgo puede emplearse como marcador genético en los estudios de líneas celulares, de individuos de familias y de poblaciones si está determinado genéticamente, se puede clasificar con certeza, si tiene un patrón de herencia inequívoco y si presenta variaciones hereditarias lo suficientemente comunes para permitir su clasificación como polimorfismo genético.

- Mutación:** Cambio en una secuencia de nucleótidos de ADN. Si ese cambio ocurre en una célula sexualmente reproductiva, éste puede ser transmitido a su descendencia.
- Nucleótido.** Subunidad química compuesta de un azúcar con cinco carbonos, un fosfato y una base nitrogenada, que forma los ácidos nucleicos ADN y ARN.
- P:** Brazo corto de un cromosoma (del francés petit).
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa. Procedimiento de laboratorio en el cual, cantidades diminutas de ADN pueden ser copiadas millones de veces en unas pocas horas.
- Perito:** Persona experta o experimentada en una ciencia y arte.
- Polimorfismo:** Presencia simultánea en una población de formas variantes de un gen particular.
- Polinucleótido:** Cadena lineal de moléculas nucleotídicas
- Q:** Brazo largo de un cromosoma:
- Recesivo:** Se dice que un gen es recesivo si sólo se expresa cuando está en su forma homocigótica.
- RFLP:** También conocida como Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción. Variación en los tamaños de los fragmentos de ADN cortados por las enzimas de restricción. las secuencias de los RFLP son útiles como marcadores en la construcción de mapas de ligamiento genético.
- Servicios Periciales:** Son el conjunto de actividades desarrolladas por especialistas en determinadas ciencias técnicas las cuales previo examen de una persona, un hecho un mecanismo, una cosa o un cadáver emiten un dictamen traducido en puntos concretos y fundado en razonamiento técnicos.

Secuencia del ADN:

El proceso de descifrar el orden de las bases nitrogenadas que componen una molécula de ADN:

Variación:

Diferencias en la frecuencia de genes y rasgos entre organismos individuales de una población.