

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“Determinación del perfil genético de personas desconocidas, familiares y pruebas de paternidad en el Instituto de Ciencias Forenses”

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

Aspectos sociosanitarios, políticos y legales de la práctica profesional del
Q.F.B.

Alumna: López Fanttini Norma Angélica Matrícula: 2113058550

Asesor Interno: Dr. Juan Esteban Barranco Florido.

Asesor Externo: M.C López Armenta Mauro

Lugar de Realización: Laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias Forenses de la Ciudad de México.

Fecha de inicio y terminación: del 25 de Enero al 25 de Julio de 2016

Octubre, 2016

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| Antecedentes..... | 4 |
| Sistema ABO..... | 4 |
| Sistema HLA..... | 6 |
| Huella genética | 7 |
| OBJETIVOS..... | 9 |
| DESARROLLO TEÓRICO..... | 10 |
| Conservación del ADN humano en muestras de sangre..... | 10 |
| Muestras de sangre..... | 10 |
| Contenido en las tarjetas FTA..... | 11 |
| Especificaciones de las tarjetas FTA..... | 11 |
| Recolección de muestras de sangre..... | 13 |
| Extracción de ADN en muestras de sangre..... | 14 |
| Chelex® 100 resina quelante..... | 14 |
| Justificación..... | 14 |
| Procedimiento..... | 15 |
| Marcadores genéticos en identificación humana..... | 16 |
| Reacción en cadena de polimerasa..... | 18 |
| Procedimiento..... | 19 |
| Análisis de fragmentos..... | 20 |
| Procedimiento..... | 20 |
| Área de trabajo..... | 21 |
| CONCLUSIÓN..... | 24 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |
| Vo. bo. del contenido académico..... | 27 |
| RESUMEN..... | 29 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 30 |
| Vo. bo. del contenido académico..... | 31 |

Determinación del perfil genético de personas desconocidas, familiares y pruebas de paternidad en el Instituto de Ciencias Forenses

Introducción

Cada año se recurre más al análisis genético como recurso para la identificación humana. Entre el año 2010 y Enero de 2015 cerca de 400 cadáveres en promedio fueron registrados como “personas desconocidas” según el Instituto Nacional de Ciencias Forenses (INCIFO).

El departamento de identificación del INCIFO se encuentra integrado por varias áreas, entre las cuales destaca el departamento de genética forense, la cual permite la identificación individual deseable en diversas situaciones como; crímenes de índole violento, pruebas de paternidad e identificación de personas desaparecidas.

La metodología en la genética forense es fundamental para una correcta, concisa y rápida identificación de un individuo, es por ello que en el presente trabajo se abarcan los aspectos fundamentales para extraer el ADN de una muestra sanguínea, los cuales se utilizan todos los días en el INCIFO dando como resultado perfiles genéticos que ponen punto final a todo tipo de averiguaciones judiciales, en la actualidad las pruebas de índole genético son cruciales y en muchos casos tienen un papel inapelable.

Este documento presenta la compilación metodológica para un análisis molecular de muestra de sangre que permitan obtener perfiles genéticos de cadáveres, además de familiares para su identificación y pruebas de paternidad que se llevan a cabo en el laboratorio del instituto de Ciencias Forenses.

Marco teórico

Antecedentes

En la historia de la identificación humana existen diversas técnicas de análisis sanguíneos que se han ido desarrollando a lo largo del tiempo, el descubrimiento de distintas patogenicias e individualidades han sido el punto de partida para la identificación humana.

En el año 1901 los antígenos del sistema ABO- también llamados grupos sanguíneos fueron descubiertos por Karl Landsteiner quien observó que "En un número de casos pertenecientes a un grupo (A), su suero reacciona a los glóbulos sanguíneos de otro grupo (B), pero no a los de su propio grupo, mientras que los glóbulos de los integrantes del grupo A obtienen similar respuesta del suero de los del grupo B. En un tercer grupo (C), el suero puede aglutinar los glóbulos de los grupos A y B, aunque el suero de éstos no responde a los glóbulos del primero"

(Landsteiner 1901)

Sistema ABO.

El sistema ABO, está conformado por la transferencia de azúcares específicos mediante enzimas llamadas transferasas que actúan en varias zonas ubicadas en la superficie de los eritrocitos. A nivel genético el locus ABO es localizado en el brazo largo del cromosoma 9, se traduce en una proteína (transferasa) que es específica para cada uno de los grupos: A (N-acetil-glucosamin transferasa); B (D-galactosil transferasa) y O (fucosil transferasa). (*Technical manual Power Plex® 2016*)

Clasificación de grupos sanguíneos:

- Tipo A
- Tipo B
- Tipo AB
- Tipo O

Con posterioridad aplicando la misma técnica se descubren otros grupos entre ellos el Rh.

“El sistema ABO se utilizó legalmente por primera vez y con gran eco en 1924, en Alemania; pero su utilización procedía de las justicias italiana, escandinava y austriaca. En los Estados Unidos de Norteamérica, la asociación médica aprobó el uso de esta técnica en 1937”. (Mojica 2003)

En 1910 von Dürgen y Hirschfeld dan a conocer las bases de la heredabilidad en los sistemas sanguíneos, la cual establece que las características A y B en la sangre no pueden aparecer en un niño a menos que estén presentes en la sangre de uno o de ambos progenitores. De la misma manera, personas del grupo AB no pueden dar descendencia tipo O, ni las personas tipo O pueden engendrar hijos tipo AB. (Figura 1)

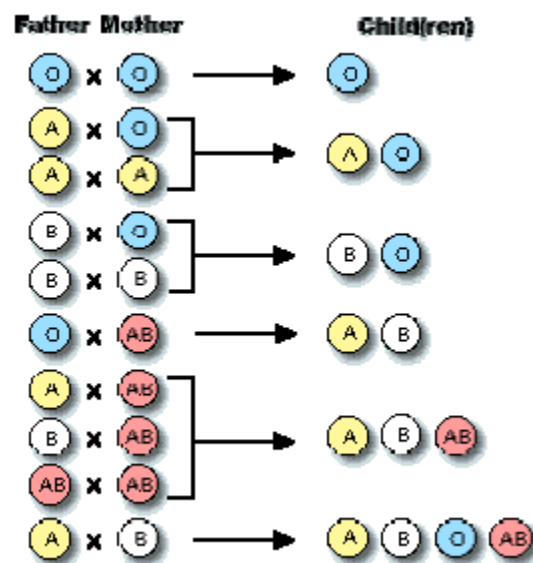


Figura1. Heredabilidad del tipo sanguíneo (Facultad de medicina U.A.E 2016)

Sistema HLA

El sistema “Human Leucocyte Antigen” (HLA) o también llamado “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” (CMH) fue descubierto por el científico Jean Dausset en 1916. Dicho sistema trata de una región genética que se ubica en el brazo corto del cromosoma 6 para los antígenos HLA, los cuales provocan la respuesta de las células T.

Los HLA son moléculas presentes en los leucocitos de la sangre y en la superficie de la mayoría de los tejidos del cuerpo humano, defienden al organismo de agentes extraños que generan infecciones.

El sistema HLA es transmisible de padres a hijos con una genética de gran polimorfismo la cual menciona que es casi imposible encontrar dos individuos sin parentabilidad que sean idénticos para las variables del sistema.

En la actualidad el HLA en conjunto con el polimorfismo de ADN ha llegado a un dato estadístico de 1 en 1000 millones de que una persona comparta al azar un determinado patrón genético con otra persona sin que exista un vínculo biológico.

Al darse una transmisibilidad de padres a hijos haplóticamente se toma como base técnicas para establecer en los casos de juicios filiatorios, de esta manera se introduce específicamente en el sistema legal en 1972 en Alemania. (Albarellos 2009)

Los anteriores marcadores genéticos presentan limitaciones cuando se trata de analizar muestras degradadas o en cantidades muy pequeñas lo cual sucede con mucha frecuencia en el trabajo forense. (*Genética forense 2016*)

Huella genética

En Septiembre de 1984 Sir Alec Jeffreys se da cuenta del potencial en la aplicación forense de las variables en la secuencia genética y desarrolla una técnica que conlleva a la extracción de ADN con lo cual obtiene lo que el llamo "DNA fingerprint" o huella genética. (Goodwin, Linacre & Hadi 2011)

La huella genética como lo expuso Jeffreys se da a partir de regiones en el ADN que contienen secuencias repetidas, el número de repeticiones es de manera consecutiva. En cada individuo el número de secciones repetidas es único, es decir, que difiere de un individuo a otro. La técnica que desarrollo examina la variabilidad de las longitudes de las secuencias repetidas en el ADN.

Las repeticiones de una secuencia específica dentro del ADN son llamadas Repeticiones en Tandem de Número Variable (VNTR), las diferencias entre las longitudes de fragmentos de restricción (RFLP) se les denominan con el nombre de polimorfismo. Para examinar las regiones de VNTRs se utilizan enzimas de restricción o endonucleasa, las cual reconocen una secuencia específica de bases y rompen el ADN cerca de la misma (Butler 2005).

Genética Forense

El ADN que no es transcrito a ARN y no codifica para ningún gen en particular se le llama ADN no codificante, este ADN no expresivo posee la característica de ser altamente polimórfico lo que da origen a una variabilidad enorme entre individuos. Aproximadamente la mitad del ADN no codificante es repetitivo, en la genética forense el ADN a analizar es el repetido en tándem.

Inicialmente se utilizó los RFLP para fines forenses analizando el ADN repetitivo específicamente enfocándose en el ADN minisatélite. Posteriormente se analizaría con mayor eficacia por medio de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) (Jarreta 1999).

Los loci mini y microsatélite pertenecen a la categoría de los VTR, las unidades de repetición son muy pequeñas (2-5 bp) por los que se les llamo Secuencias Cortas

Repetidas en Tándem (STR) en los minisatélites las unidades de repetición son mayores (10-80 bp) (Jarreta 1999).

Debido a las limitaciones que surgieron al trabajar con muestras degradadas (tiempo, recursos, cantidad de la muestra obtenida) se creó la técnica de PCR , que consiste en la amplificación in vitro de secuencias de ADN específicas, sin importar que la muestra provenga de cantidades pequeñas (ejemplo : Una gota de sangre) incluso si el material presenta degradación parcial, además PCR permitió que el procedimiento fuera automatizado al generar un gran número de copias de la secuencia específica del ADN diana. Otra de las grandes ventajas se basa en que una vez amplificado el ADN puede ser analizado por varios métodos que revelan los alelos presentes en los loci definidos.

Actualmente existen en los mercados diversos Kits de marcadores genéticos, que permiten el análisis a partir de una muestra biológica, los cuales son utilizados para PCR al ser selectivos para los distintos mini, microsátélites y STRs, enfocando a la genética forense en su estudio (Jarreta 1999).

Objetivos

General:

- Compilar la metodología bibliográficamente para la obtención de un perfil genético humano.

Específicos:

- Identificar las condiciones óptimas para la conservación del ADN humano en muestras de sangre
- Determinar los fundamentos de la amplificación por PCR en muestras de sangre
- Describir las características de los primers en identificación humana en muestras de sangre
- Determinar los fundamentos de la secuenciación genética a partir de muestras de sangre

Desarrollo teórico

Conservación de ADN en muestra de sangre

La identificación de una persona es posible a través de pequeñas muestras de células con ADN viable para su posterior amplificación. Para evitar la degradación de la muestra es necesario realizar diferentes procedimientos de almacenamiento, las principales muestras resguardadas

En el análisis de identificación humana se tienen dos tipos de muestras; Biológicas de referencia las cuales se sabe la procedencia (sangre, saliva) y muestras forenses (tejido muscular, hueso, manchas de sangre, células espermáticas, tejido en bloques de parafina) para la obtención de un ADN puro (Genética página web 2016).

Muestras de sangre

Las tarjetas de tecnología rápida para el análisis de ácidos nucleicos (Por sus siglas FTA) de Whatman® son las más recomendables en el mercado para el transporte, registro y aislamiento de ácidos nucleicos a temperatura ambiente. Las tarjetas FTA Whatman ® contienen productos químicos que lisan las células, desnaturalizan las proteínas y protegen los ácidos nucleicos de las nucleasas, la oxidación y los daños causados por radiación UV. Estas tarjetas inactivan rápidamente organismos, como los patógenos de transmisión hemática, e impiden el crecimiento de bacterias y otros microorganismos, además necesitan poco espacio para su almacenamiento (Whatman FTA® Technology 2016).

Contenido en las tarjetas FTA

- i) Un medio sólido (preferible celulosa absorbente)
- ii) Una base monovalente débil (tal como "Tris", metano tris-hidroximetil ya sea como la base libre o como el carbonato)
- iii) Un agente quelante (tal como EDTA, ácido diaminetetracético de etileno)
- iv) Un detergente aniónico (tal como SDS, dodecilsulfato de sodio)
- v) ácido úrico o una sal úrica.(opcional)

Especificaciones de las tarjetas FTA

Medio sólido: Un medio sólido preferido particularmente de acuerdo con este aspecto de la invención comprende una celulosa absorbente - papel base, tal como papel de filtro que tiene una carga mínima.

Base monovalente débil: se utiliza para obtener un pH alcalino entre 8,0 y 9,5 que se imponga sobre la sangre que se coloca sobre la matriz. Con el objetivo de asegurar la acción apropiada del agente quelante sobre los metales divalentes de unión. También previene la acción de las nucleasas ácidas que no son tan dependientes de metales divalentes. La base puede ser una orgánica débil (Tris), otras alternativas inorgánicas son: carbonato de metal alcalino o bicarbonato, por ejemplo sodio, litio o carbonato de potasio o bicarbonato, pueden ser utilizados.

Agente quelante: Es preferiblemente un agente quelante fuerte tal como EDTA, sin embargo, una amplia gama de agente quelantes fuerte adecuados están comercialmente avalados. La función del agente quelante es unir los iones de metales divalentes, magnesio y calcio, también para unir a iones de metales de transición, particularmente hierro, calcio y magnesio ya que se sabe que promueven la degradación del ADN actuando como cofactores para enzimas. Los iones metálicos tales como hierro, que experimentan fácilmente la oxidación y la reducción también dañan los ácidos nucleicos mediante la producción de radicales libres.

Detergente aniónico: El tensoactivo aniónico o detergente se incluye en la composición debido a que actúa como agente desnaturizante principal. Cualquier detergente aniónico fuerte que desnaturalice proteínas es adecuado, así como SDS mencionado anteriormente otros detergentes, tales como lauril sarcosinato de sodio también se puede usar. El detergente aniónico provoca que la mayoría patógenos se inactiven debido a la destrucción no específica de la estructura secundaria de sus proteínas en su cubierta, sus proteínas internas y cualquier membrana que puede ser dependiente. Hay excepciones, ya que el detergente aniónico no inactiva las esporas bacterianas más resistentes, ni algunos enterovirus (extremadamente estables) sin embargo, estas excepciones son agentes que son susceptibles de ser transferidas por contacto ordinario, actualmente no hay gran preocupación de que estos agentes constituyen un riesgo en la sangre (Burgoyne 1996).

Ácido úrico o una sal de urica: De acuerdo con la FTA se ha encontrado que es particularmente importante para el almacenamiento a largo plazo del ADN debido a que realiza una serie de funciones, en primer lugar se convierte en aleación actuando como trampa de "radicales libres" que acepta preferentemente radicales libres, que de otro modo dañan la base guanina en el ADN. Tales radicales libres se generan por la oxidación espontánea de grupos tio en la proteína de suero desnaturizada, y también pueden ser generados por la gran cantidad de hierro en la sangre. El ácido úrico también actúa como una superficie erosionable debido a que es un ácido débil poco soluble para que el material del ADN se encuentre seco sobre sus cristales (Burgoyne 1996).

Recolección de muestra de sangre

Manipulación: Usar en todo momento guantes estériles para evitar la contaminación de las tarjetas FTA. Se recomienda seguir las precauciones universales para el manejo de muestras biológicas.

Procedimiento:

1. Etiquetar la tarjeta de FTA con la identificación apropiada de la muestra (nombre, n° de expediente, fecha y sexo).
2. Aplicar de la sangre de dos a tres gotas para sujetos vivos y embeber toda la tarjeta en el caso de occisos (<125 l por círculo de 1 pulgada, <75 l por $\frac{3}{4}$ pulgadas círculo) en la tarjeta en una circular concéntrica.
3. Dejar que las muestras se sequen a temperatura ambiente, no tocar, no frotar, no manchar de sangre el resto de la tarjeta, ni calentar o ayudar durante la etapa de secado de la muestra ya que esto podría fijar inhibidores de la PCR en la matriz.
4. Observar que las gotas de sangre seca son más oscuras que recién las gotas frescas.
5. Almacenar la muestra lista para su procesamiento o archivo, en un ambiente libre de humedad (*Instruction Manual Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin* (n.d)).

Extracción de ADN en muestras de sangre

El proceso de extracción que a continuación se describe es basado en un método llamado extracción de ADN por la resina Chelex® -100

Chelex® 100 resina quelante

Chelex-100 es una resina quelante, se compone de copolímeros de estireno-divinilbenceno que contienen iones de iminodiacetato emparejados los cuales actúan como grupos quelantes, la resina chelex®-100 es de intercambio iónico tiene alta preferencia para cobre, hierro, y otros metales pesados más de cationes monovalentes tales como sodio y potasio. Su selectividad para iones divalente sobre iones monovalente es de aproximadamente 5,000 a 1, posee una muy fuerte atracción para los metales de transición, incluso en soluciones concentradas altamente salinas (*Instruction Manual Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin* (n.d)).

Justificación

Se han desarrollado diferentes procesos para la utilización de Chelex®-100 para la extracción de ADN de muestras de tipo forense y su posterior uso con la técnica PCR. Debido a que el procedimiento es sencillo, rápido, no implica ningún disolvente orgánico y se tienen mínimas transferencias de tubos para la mayoría de tipos de muestras. La extracción de ADN en pequeñas manchas de sangre utilizando Chelex®-100 es tan eficiente o inclusive más eficiente que el uso del clásico método de extracción con fenol-cloroformo.

Los métodos de extracción de ADN han incluido principalmente etapas de separación y purificación por ejemplo: extracciones fenol-cloroformo y / o precipitación con etanol. Tales procedimientos de extracción inorgánicos utilizan altas concentraciones de sal, exceso de digestión con proteinasa K y el uso de polvo de vidrio. Estos métodos tienen éxito en la recuperación de ADN de alto peso molecular a partir de muestras de gran tamaño, que requieren varios pasos y pueden incluir las transferencias de los extractos de ADN a contenedores adicionales o procedimientos de lavado que requieren varios filtros comerciales o

columnas. Estos pasos adicionales aumentan la introducción de contaminantes a la muestra.

Procedimiento

Se realizan tres cortes de la tarjeta FTA de aproximadamente 1.2 mm utilizando un sacabocados la sangre seca se resuspende varias veces utilizando vórtex un par de veces de 2- 3 min. Se transfiere dentro de un tubo para centrifuga y se centrifuga 30 seg a 13000 rpm. Se retiran los cortes se vuelve a centrifugar por un min a 13000 rpm, el sobrenadante obtenido se desecha y al botón que se observa en la parte inferior se le vierten utilizando un bulbo estéril , 4 gotas de resina Chelex ,100 µL de agua y 20 µL de proteinasa k , se encuba 50 min a 56 °C, posteriormente se coloca el tubo a baño maría de 8 a 10 min, se retira y dar vórtex de 5 a 10 seg, luego se centrifuga 30 seg a 13000 rpm y el sobrenadante transferirlo a un tubo limpio y rotulado (*AmpliType User Guide* 1990) (Walsh, Metzger, & Higuchi 1991).

Marcadores genéticos en identificación humana (primers)

Los primers localizan ciertas regiones de ADN que contienen secuencias repetitivas una y otra vez, el número de secciones repetidas presentes en una muestra puede diferir entre cada individuo.. Estas regiones de repetición de ADN son conocidos como número variable de repeticiones en tándem (STR). La técnica utilizada por el Dr. Jeffreys para examinar el STR fue llamado restricción de longitud de fragmentos polimórficos (RFLP), ya que implicó el uso de una enzima de restricción (primers) para cortar las regiones del ADN que rodea el STR. (6)

El kit AmpF \mathcal{L} STR[®] Identifiler[®] Kit directa PCR “utilizado en pruebas de paternidad, maternidad y pruebas de parentesco,” optimiza el tiempo de amplificación sin comprometer los resultados manteniendo la calidad en los perfiles de ADN obtenidos (Butler 2005).

Debido a que la principal muestra biológica es sangre se prefiere El AmpF \mathcal{L} STR[®] Identifiler[®] Kit directa PCR ya que no requiere que la muestra esté purificada (23).El kit AmpF'STR Identifiler PCR para amplificación directa es un ensayo multiplex de repetición en tándem corto, permite la amplificación directa de muestras de sangre y bucal de una sola fuente en una tarjeta FTA sin la necesidad de purificación y cuantificación de la muestra. este multiplex ensayo ha sido validado de acuerdo con las Normas / Nacionales del FBI y directrices SWGDAM, los resultados muestran que las ligeras variaciones en las concentraciones de cebadores (primers), la concentración de componente de mezcla maestra, y los parámetros de ciclo térmico no afectan al rendimiento de la química.

Los ensayos que validan el uso del kit AmpF'STR Identifiler se realizaron mediante la amplificación de cantidades conocidas de células diana en manchas de sangre obtenidas de tarjetas de FTA, implantando contaminación cruzada con ADN no humano. En el estudio no se observó efecto en el tiempo de la muestra almacenada en las tarjetas FTA y se estableció la concordancia completa en el estudio de población. Dichos hallazgos del estudio de validación apoyan el uso del

kit directo para Identifiler, para pruebas forenses y muestras en base de datos genotípicas (Wang, Chang, Lagacé, Oldroyd & Hennessy 2011).

La siguiente tabla muestra los loci amplificados, sus localizaciones cromosómicas, y el correspondiente marcador fluorescentes. La escalera alélica es AmpFISTR® Identifiler® utilizada para determinar el genotipo de las muestras analizadas. Los alelos contenidos en la escalera alélica y el genotipo del ADN de control AmpFISTR® 9947A también se enumeran en siguiente tabla. (AmpFISTR® Identifiler® 2009)

Tabla 1 Identifiler® Kit loci y alelos

| Locus designation | Chromosome location | Alleles included in AmpFISTR® Identifiler® Allelic Ladder | Dye label | Control DNA 9947A |
|-------------------|---------------------------|--|-----------|-------------------|
| D8S1179 | 8 | 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 | 6-FAM™ | 13† |
| D21S11 | 21q11.2-q21 | 24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38 | | 30‡ |
| D7S820 | 7q11.21-22 | 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 | | 10, 11 |
| CSF1PO | 5q33.3-34 | 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 | | 10, 12 |
| D3S1358 | 3p | 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 | VIC® | 14, 15 |
| TH01 | 11p15.5 | 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3 | | 8, 9.3 |
| D13S317 | 13q22-31 | 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 | | 11§ |
| D16S539 | 16q24-qter | 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 | | 11, 12 |
| D2S1338 | 2q35-37.1 | 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 | | 19, 23 |
| D19S433 | 19q12-13.1 | 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2 | NED™ | 14, 15 |
| vWA | 12p12-pter | 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 | | 17, 18 |
| TPOX | 2p23-2per | 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 | | 8†† |
| D18S51 | 18q21.3 | 7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 | | 15, 19 |
| Amelogenin | X: p22.1-22.3 Y: p11.2 | X, Y | PET® | X |
| D5S818 | 5q21-31 | 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 | | 11‡‡ |
| FGA | 4q28 | 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2 | | 23, 24 |

† For CODIS purposes, profile reported as 13, 13.

‡ For CODIS purposes, profile reported as 30, 30.

§ For CODIS purposes, profile reported as 11, 11.

†† For CODIS purposes, profile reported as 8, 8.

‡‡ For CODIS purposes, profile reported as 11, 11.

Reacción en cadena de polimerasa

Al obtenerse el genoma es preciso realizar una técnica que permita su amplificación. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) copia secuencias específicas de ADN mediante un ciclo de reacciones invitro, empleando oligonucleótidos elaborados sintéticamente los cuales tienen como función complementar una región diana, los dos cebadores oligonucleótidos son para los extremos 5' y 3' de la secuencia a clonar del ADN. La reacción de PCR se fundamenta en tres pasos los cuales forman un ciclo, el número de copias del genoma dependerá del número de veces que se repita el ciclo. Cada ciclo que dura aproximadamente 5 minutos, y en menos de 3 horas (25-30 ciclos) la cantidad de ADN aumenta más de un millón de veces. PCR no requiere ADN de alto peso molecular nativo con el fin de amplificar las secuencias diana. Sólo la secuencia diana necesita estar intacta. Por lo consiguiente, la técnica de PCR puede amplificar ADN parcialmente degradado y/o desnaturalizado. PCR tiene un gran beneficio potencial para el análisis de muestras de trabajo de casos forenses, en la que la cantidad y molecular. El peso de ADN puede ser menos que óptimo para el análisis por otros métodos (Klug, Cummings & Spencer 2013). “Se ha reportado que Chelex®- 100 funciona como un medio para aumentar la señal de la amplificación por PCR de pequeñas cantidades de ADN liberado en pequeñas cantidades de células de cultivo de tejidos que han sido cocidos. La presencia de Chelex®-100 durante la ebullición evita la degradación del ADN por quelantes de iones metálicos que pueden actuar como catalizadores en la descomposición de ADN a altas temperaturas en soluciones de fuerza iónica baja”

Los procedimientos adaptados para las muestras forenses se basan en suspensiones de células en ebullición en una suspensión de 5% de Chelex®, seguido de la amplificación de una fracción del sobrenadante para PCR sin pasar por la purificación. La alcalinidad de las suspensiones de Chelex (pH 10-11) y la exposición a temperaturas de 100°C dan como resultado la interrupción de las membranas de las células y la desnaturalización del ADN. Debido a que estos procedimientos resultan en Chelex ADN de la muestra desnaturalizada, el ADN no es adecuado para el análisis RFLP (Walsh, Metzger, & Higuch 1991).

Procedimiento

Mezcla de reacción para amplificación

En un tubo eppendorf® colocar 2.5 µl del genoma obtenido de la extracción de ADN por el método de Chelex®, 2.5 µl de agua (con alto grado de pureza) y 1.2 µl de primers

Programación de multiplex-pcr

Paso inicial 5 min 94 °C

-Desnaturalización

El ADN de doble cadena que contiene el genoma extraído se desnaturaliza calentándolo a 94 °C por 30s 94°C, lo que lo disocia en sus cadenas sencillas, se recomienda que el ADN este purificado (Klug, et al. 2013).

-Hibridación

Se disminuye la temperatura hasta 58 °C por 1 min en la cual los cebadores se unen al ADN de cadena sencilla, los cebadores oligonucleicos poseen de 15 a 30 nucleótidos de longitud los cuales son complementarios a la secuencia que flanquean del ADN diana a copiar. Los cebadores sirven de punto de iniciación para la síntesis de las nuevas cadenas de ADN complementario (Klug, et al. 2013).

-Extensión

A la mezcla de reacción se le añade un ADN polimerasa resistente al calor, (Taq polimerasa). Se lleva la temperatura a 72°C por 2 min se repite 30 ciclos. La taq polimerasa extiende los cebadores añadiendo nucleótidos en dirección 5'-3' realizando una copia de doble cadena del ADN diana (Klug, et al. 2013).

Por último se le aplica 72 °C por 10 min para la elongación final (Von Wurmb-Schwark, et al. (2009).

Análisis de fragmentos

Una vez realizada la amplificación por medio de PCR es necesario poder interpretarla, para ello se utiliza se utiliza un analizador genético automatizado 3130 y el software GeneMapper ID-X, teniendo éste último una herramienta novedosa para la interpretación y análisis de las muestras biológicas (*Genética pagina web 2016*).

Procedimiento

Preparar una mezcla de carga combinando size estándar y formamida como se indica:

0.7µl estándar + 50 µl formamida

De la mezcla anterior tomar 12 µl y depositar en los pozos marcados para mezcla estándar. Añadir 0.4 µl del material amplificado a cada pocillo sin introducir aire.

Tapar los pocillos con los septos e introducir al analizador genético automatizado 3130

Nota: El volumen de la norma carril interno utilizado en el cóctel de carga se puede ajustar para cambiar la intensidad. (19)

Programación del software

Abrir el programa plate manager, seleccionar new y escribir la fecha.

Insertar el nombre de la placa (se sugiere las iniciales del operador)

Seleccionar los capilares a utilizar y capturar el tipo de muestra y el nombre (sin espacios entre ellos)

Seleccionar el tipo estándar y la matriz identifier

Seleccionar el protocolo de identifier y empezar el análisis

Los picos de tamaño estándar se basan en las preferencias del laboratorio *Guide Gene Mapper® ID-X Software Version 1.0.1/1.1, 2009*)

Área de trabajo

El laboratorio de genética del INCIFO se divide principalmente en 5 áreas interconectadas, en las cuales se cuenta con el equipo necesario para que los análisis tengan el flujo correspondiente y con ello evitar la mayor contaminación de las muestras posible (Imagen 2).

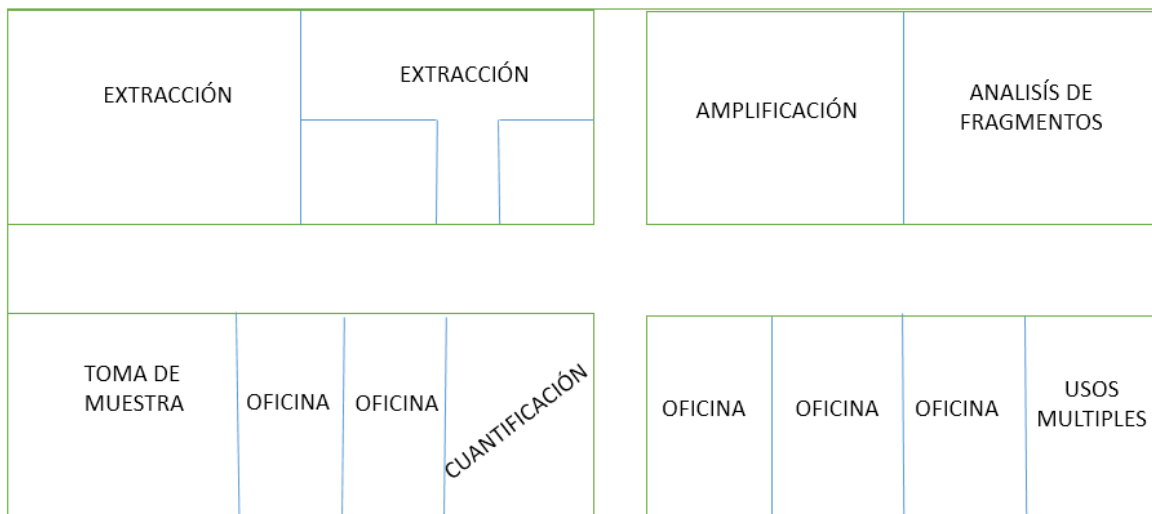


Imagen 2 Planos del laboratorio de genética del INCIFO (sin escala debido a que no son de dominio público)

- Toma de muestra
En este espacio se realizara la recolección de muestras biológicas de personas vivas
- Extracción.
Las moléculas de ADN se separarse de cualquier otro material celular antes de que éste pueda ser examinado, por consiguiente se han desarrollado métodos de extracción de ADN para poder separar las proteínas y otros materiales de las moléculas de ADN. En este lugar se procesan muestras de referencia y muestras forenses.
- Cuantificación
En esta área se valora la calidad y la cantidad de ADN humano obtenido durante el proceso de extracción y purificación (dependiendo del caso) del ADN.
La cuantificación del ADN de muestras de referencia (sangre y saliva) se realiza mediante el equipo Nanodrop marca Thermo a PCR.
- Amplificación
Para la cuantificación del ADN extraído de muestras forenses como tejido muscular, huesos, tejidos embebidos en parafina, células espermáticas en casos de violación etc., es utilizada una técnica más sensibles como la que se desarrolla en el PCR Tiempo Real marca Applied Biosystems, permitiendo conocer la concentración de ADN humano que se obtuvo posterior al proceso de extracción, es un ensayo que monitorea el producto de PCR mientras tiene lugar la amplificación, analiza ciclo a ciclo los cambios en la señal de fluorescencia generados durante las tres fases de la PCR

- Análisis de fragmentos

Para detectar los alelos de los diferentes loci de los 15 marcadores genéticos que se analizan en el laboratorio, así como el sexo de la muestra se realiza un escaneo de los productos de PCR de las muestras en estudio, el proceso se lleva a cabo de forma automatizada por medio de la medición del espacio de tiempo desde la inyección de la muestra hasta la detección por un láser que se encuentra cercano al final del capilar (Genética página web 2016).

Conclusión

El resultado obtenido de la recopilación bibliográfica ha sido una guía con una completa y sencilla estructura, la cual puede ser reproducida en específico por cualquier laboratorio que cuente con las condiciones necesarias para el análisis genético.

Las técnicas descritas poseen una total concordancia con lo aprendido en los módulos que comprenden el segmento de genética, principalmente el uso de PCR para la amplificación de ADN, creando una conexión entre el conocimiento teórico y práctico. Al mostrar el procedimiento completo para una identificación se brinda una de las múltiples causas en la utilidad de los fundamentos aprendidos dentro de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica.

El material que se plantea (uso de kits y equipo) se respalda con estudios previos en diferentes laboratorios y en diversas ocasiones ha sido utilizado en el INCIFO específicamente en el laboratorio de genética.

Con todo lo anterior se propone a la posterior investigación en muestras de otros tipos por ejemplo; saliva, tejido blando, cabello, etc... debido a que la bibliografía que se tiene en la presente tesina se enfoca únicamente a muestras de sangre, también se impulsa a buscar metodologías con mayor eficiencia tomando en cuenta a otros proveedores ya que los citados son a los que se recurren con mayor frecuencia en el país.

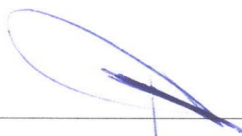
Referencias bibliográficas

1. Albarellos, L. A. (2009). *Identificación humana y bases de datos genéticos*. Ubijus, (01),20-30.
2. AmpF λ STR[®]Identifiler[®]. *Guía de usuario del Kit directa amplificación por PCR* (2009). Applied Biosystems Foster City, CA.
3. *AmpliType User Guide*, Section 3 (Sample Preparation). (1990). Cetus Corporation, Emeryville, CA.
4. Burgoyne, L. A. (1996). *U.S. Patent No. 5,496,562*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
5. Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Academic Press.
6. Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. (2), Elsevier. Academic New York.
7. Facultad de medicina U.A.E. (n.d). *Grupos sanguíneos*. Consultada el 22 de Septiembre de 2016. http://www.kardiagnostx.com/documentos/Hemato_35.pdf
8. *Genética* (n.d). Consultado del 14 al 27 de Septiembre de 2016, página web del Instituto de Ciencias Forenses <http://www.semefo.gob.mx/es/INCIFO/Genetica>
9. *Genética forense* (n.d). Consultado el 20 de Julio de 2016. https://www.um.es/biomybiotec/web/Seminarios/2008/papers/MV_Lareu_clase_genetica_forense.pdf
10. Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An introduction to forensic genetics*. (2). John Wiley & Sons
11. *Guide Gene Mapper[®] ID-X Software Version 1.0.1/1.1* (2009). Applied Biosystems.
12. *Instruction Manual Chelex[®] 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin* (n.d), Bio-Rad Laboratories.
13. *Instructions for Use FTA[™] Cards* (2013). Whatman[™].

14. Iyavoo, S., Wolejko, A., Furmanczyk, D., Graham, R., Myers, R., & Haizel, T. (2015). *Reduced PCR cycling time amplification using AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifier $\text{\textcircled{R}}$ kit. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. (5). 286-288.*
15. Jarreta, M. B. M. (1999). *La prueba del ADN en medicina forense: la genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad. Masson S.A. 150-180.*
16. Klug, W. S., Cummings, M. R., & Spencer (2013). *Conceptos de genética. Palladino (08). 25-42*
17. Landsteiner, K. (1901). *Ueber agglutinationserscheinungen normalen menschlichen blutes. Wien Kli Wchnschr, 14, 1132-1134.*
18. Mojica Gómez, L. (2003). *La prueba técnica ADN en los procesos sobre filiación. Estudios Socio-Jurídicos, 5(1), 250-265.*
19. *Technical manual Power Plex $\text{\textcircled{R}}$ Fusion System (2016). Promega.*
20. Torres, F, Márquez E & Cruz L (n.d). *Grupos sanguíneos*. Obtenida 13 de Julio de 2016, de http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/170_cienciorama.pdf
21. Von Wurmb-Schwark, Nicole, et al. (2009). *A new multiplex-PCR comprising autosomal and y-specific STRs and mitochondrial DNA to analyze highly degraded material. Forensic Science International: Genetics 3(2). 96-103.*
22. Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 10(4), 506-513.*
23. Wang, D. Y., Chang, C. W., Lagacé, R. E., Oldroyd, N. J., & Hennessy, L. K. (2011). *Development and Validation of the AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifier $\text{\textcircled{R}}$ Direct PCR Amplification Kit: A Multiplex Assay for the Direct Amplification of Single-Source Samples. Journal of forensic sciences, 56(4), 835-845.*
24. Whatman FTA $\text{\textcircled{R}}$ Technology. Citado el 10 de Agosto de 2016. http://www.laboplus.pl/images/stories/Whatman/pdf/fta/fta_w_kryminalistyce.pdf



Vo. Bo. Asesor Interno
Dr. Juan Esteban Barranco Florido.



Vo. Bo. Asesor Externo
M.C. López Armenta Mauro

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

“Determinación del perfil genético de personas desconocidas, familiares y pruebas de paternidad en el Instituto de Ciencias Forenses”

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

Aspectos sociosanitarios, políticos y legales de la práctica profesional del
Q.F.B.

Alumna: López Fanttini Norma Angélica Matrícula: 2113058550

Dirección: And Luis Collado Mz 7 Lt 24 4 sec. Col Unidad Ermita Zaragoza
Del Iztapalapa. Ciudad de México. CP: 09180

Tel (s): 57324066 y 0445519511348

Asesor Interno: Dr. Juan Esteban Barranco Florido.

Asesor Externo: M.C López Armenta Mauro

Lugar de Realización: Laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias
Forenses de la Ciudad de México.

Fecha de inicio y terminación: del 25 de Enero al 25 de Julio de 2016

Octubre, 2016

Resumen

Los avances en las técnicas a través de la automatización, computarización, las mejoras en la sensibilidad y aplicación del método permiten la investigación y examen de los escenarios de diversos delitos con la perfilación de diversas muestras biológicas humanas (sangre, semen, saliva, piel, cabello con bulbo y otros tejidos) encontradas en la escena del crimen. La perfilación del ADN puede ahora ser usada para establecer la paternidad inequívoca o la identidad verdadera de un individuo, vincular a un sospechoso en la escena de un crimen o de una víctima. (Jarreta. B 199))

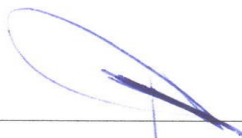
Se tomó en cuenta el tipo más común de muestra recibida en el laboratorio de genética del INCIFO la cual es sangre. Basándose en la bibliografía que utilizan los peritos en el laboratorio se recopiló la metodología para obtener un perfil genético a partir de una muestra de sangre utilizando técnicas concisas y claras para que se pueda llevar a cabo posteriormente la experimentación.

Referencias bibliográficas

Jarreta B. (,1999.). *La prueba del ADN en medicina forense: la genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad*. Masson.



Vo. Bo. Asesor Interno
Dr. Juan Esteban Barranco Florido.



Vo. Bo. Asesor Externo
M.C. López Armenta Mauro