

**Diagnóstico genético del sexo mediante el gen de la
Amelogenina de aplicación forense, en una muestra de
la población de Caracas, Venezuela**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS
DIRECCIÓN DE POST-GRADO
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA



Diagnóstico genético del sexo mediante el gen de la Amelogenina de aplicación forense, en una muestra de la población de Caracas, Venezuela

Autor:

ROSNELD ALFONZO RIVERO DIAZ

Bárbula, Diciembre de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS
DIRECCIÓN DE POST-GRADO
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA



Diagnóstico genético del sexo mediante el gen de la Amelogenina de aplicación forense, en una muestra de la población de Caracas, Venezuela.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Dirección de Postgrado como
requisito para optar al título de Especialista en Criminalística

Tutor:
Esp. Hiorley Almaral
C.I.V- 13.236.494

Autor:
Lic. Rosneld Rivero
C.I.V-19.960.551

Bárbula, Diciembre de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

VEREDICTO DEL JURADO

Nosotros, miembros del jurado designado por la comisión coordinadora de la "ESPECIALIZACION EN CRIMINALISTICA" de la Facultad de Ciencias Jurídicas y Políticas de la Universidad de Carabobo, para la evaluación del trabajo de grado mencionado: "DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL SEXO MEDIANTE EL GEN DE LA AMELOGENINA DE APLICACIÓN FORENSE, EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE CARACAS, VENEZUELA" presentado por ROSNELD ALFONZO RIVERO DIAZ, titular de la cedula de identidad N° 19.960.551, acordamos que dicha investigación, cumple los requerimientos de forma y fondo para optar por el título de "ESPECIALISTA EN CRIMINALISTICA", consideramos que el mismo reúne los requisitos para ser calificado como:

A P R O B A D O

Apellidos y Nombres

MENDOZA Gerales Bladimir E.
Blonzález Medina Miriam
Namy Yamilet Benilda de Guara

Firma

[Firma]
[Firma]
[Firma]

Valencia, Mayo 2018



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS
DIRECCIÓN DE POST-GRADO
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA



ACTA DE APROBACION DEL PROYECTO



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD DE CIENCIAS JURIDICAS Y POLITICAS
DIRECCIÓN DE POSTGRADO COORDINACIÓN DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA

ACTA DE APROBACIÓN

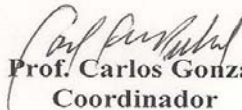
PROYECTO ESPECIAL DE GRADO

Por medio de la presente hacemos constar que el Proyecto de Trabajo de Grado titulado: **“DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL SEXO MEDIANTE EL GEN DE LA AMELOGENINA DE APLICACIÓN FORENSE, EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE CARACAS, VENEZUELA”** presentado por el ciudadano (a): **ROSNELD RIVERO, CÉDULA DE IDENTIDAD NRO. V-19.960.551**, alumno (a) del Programa: **ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA**, reúne todos los requisitos exigidos para la inscripción y aprobación del mismo.

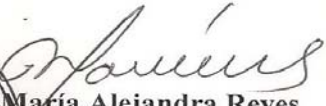
La profesora: **HIORLEY ALMARAL**, aceptó la tutoría del trabajo.

En el Campus Bárbula, a los 15 días del mes de Septiembre de 2017.

Por la Comisión Coordinadora:


Prof. Carlos González
Coordinador




Prof. Eloisa Sánchez
Integrante de la Comisión

Prof. María Alejandra Reyes
Integrante de la Comisión



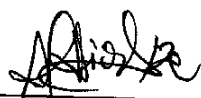
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS
DIRECCIÓN DE POST-GRADO
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA



CONSTANCIA DE ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Dando cumplimiento a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo en su Artículo 133, quien suscribe, la Esp. Hiorley Almaral, titular de la cedula de identidad No. V-13.236.494, en mi carácter de Tutor del Trabajo de Especialización en Criminalística, titulado: **“DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL SEXO MEDIANTE EL GEN DE LA AMELOGENINA DE APLICACIÓN FORENSE, EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE CARACAS, VENEZUELA.”**, propuesto por el ciudadano, Lic. ROSNELD ALFONZO RIVERO DIAZ, titular de la cedula de identidad No. V- 19.960.551, para optar al Título de ESPECIALISTA EN CRIMINALÍSTICA, hago constar que dicho Trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la aprobación y evaluación por parte de la Comisión Coordinadora de Post-Grado de la Facultad de Ciencias Jurídicas y Políticas de la Universidad de Carabobo.

En Bárbula, a los siete días del mes de diciembre del año 2016


Esp. Hiorley Almaral
C.I.V- 13.236.494



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS
DIRECCIÓN DE POST-GRADO
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA



AUTORIZACIÓN DEL TUTOR

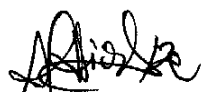
Yo, **Esp. Hiorley Almaral**, en mi carácter de Tutor del Trabajo de Especialización **X** Maestría ____ Doctoral ____

Titulado: “**DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL SEXO MEDIANTE EL GEN DE LA AMELOGENINA DE APLICACIÓN FORENSE, EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE CARACAS, VENEZUELA**”.

Presentado por el ciudadano: **Rosneld Alfonzo Rivero Díaz** Titular de la Cédula de Identidad N° **V- 19.960.551**, para optar al título de Especialista en Criminalística.

Considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En Bárbula a los 14 días del mes de diciembre del año 2017


Esp. Hiorley Almaral
C.I.V- 13.236.494

INFORME DE ATIVIDADES

Participante: Lic. **ROSNELD ALFONZO RIVERO DIAZ**, cédula de identidad No. V- 19.960.551

Tutor: Esp. Hiorley Almaral. Cédula de identidad No. V- 13.236.494

Título del Trabajo: **“DIAGNÓSTICO GENETICO DEL SEXO MEDIANTE EL GEN DE LA AMELOGENINA, DE APLICACIÓN FORENSE, EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION DE CARACAS, VENEZUELA.”**

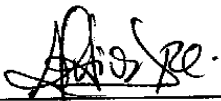
Informe y Cronograma de Actividades

Fecha	Actividad a Desarrollar	Observaciones
Febrero de 2015	✓ Ubicación del proyecto de investigación en la línea de investigación de ciencias forenses de la especialización en criminalística de la UC.	Comunicación con el Msc. Joseba Celaya, Jefe del Laboratorio de Patología Molecular del Instituto Anatomopatológico de la UCV, para la orientación de la línea de investigación del proyecto.
	✓ Búsqueda del laboratorio en donde desarrollar la tesis de la especialización en criminalística.	
Febrero de 2016	✓ Curso de la Cátedra Seminario I de la Especialización en Criminalística.	Desarrollo del título tentativo del proyecto de investigación, introducción y el planteamiento del problema.
	✓ Búsqueda de revistas científicas, libros, artículos y otras referencias bibliográficas, referentes a la genética forense y al gen de la amelogenina	
Julio de 2016	✓ Curso de la Cátedra Seminario II de la Especialización en Criminalística.	Desarrollo de los antecedentes, bases teóricas y la justificación de la investigación. Aceptación del Tutor y primeras correcciones al manuscrito.
	✓ Comunicación del proyecto a la Esp. Hiorley Almaral, a fin de solicitar su tutoría.	
Agosto de 2016	✓ Presentación del proyecto de investigación al Msc. Joseba Celaya y a la Esp. Hiorley Almaral	Aprobación de los recursos destinados al proyecto de investigación.
	✓ Planteamiento de los objetivos del proyecto de investigación.	
	✓ Inventario de los reactivos y materiales en el laboratorio de Patología Molecular, necesarios para el cumplimiento de los objetivos propuestos en el proyecto de investigación.	Correcciones al manuscrito.
Septiembre de 2016	✓ Primer borrador con los capítulos I, II y III del proyecto de investigación.	Recomendaciones y sugerencias al manuscrito
	✓ Comunicación al Comité de Bioética del Hospital Clínico Universitarios de Caracas, para la aprobación del proyecto de investigación.	Recomendaciones y sugerencias del comité de bioética, diseño de un consentimiento informado para los participantes y de una ficha para la recolección de datos.
Octubre - Noviembre de 2016	✓ Primeros entrenamientos en el laboratorio de Patología Molecular, uso de equipos y metodologías a emplear en el proyecto de investigación.	Correcciones del manuscrito e inscripción del Proyecto ante la Dirección de Postgrado
	✓ Tutorías con la Esp. Hiorley Almaral	

Tabla 1. Informe y Cronograma de Actividades

Fecha	Actividad a Desarrollar	Observaciones
Enero - Febrero de 2017	✓ Procesamiento de Muestras	Búsqueda de posibles mutaciones en el gen de la amelogénina.
Marzo 2017	✓ Análisis e Interpretación de Resultados	Desarrollo del capítulo IV y V; correcciones al manuscrito.
Abril 2017	✓ Fijación de conclusiones y recomendaciones.	Revisión final del trabajo especial de grado y presentaciones de correcciones.
Mayo – Julio de 2017	✓ Escritura del Manuscrito Final	Aprobación del Anteproyecto por la Comisión de Post-grado. Correcciones.
Noviembre – Diciembre de 2017	✓ Manuscrito Final	Inscripción del Trabajo Especial de grado ante la Dirección de Post-grado FCJP de la Universidad de Carabobo.

En Bárbula, a los siete días del mes de julio del año 2017



Esp. Hiorley Almaral
C.I.V- 13.236.494



Lic. Rusneld Rivero
C.I.V- 19.960.551

DEDICATORIA

A Rosita, a mis Hermanos y a mi Esposa.
Por recordarme siempre, que con esfuerzo y dedicación todo se puede,
se superan dificultades, se vencen obstáculos y se construye la vida.
Gracias por Apoyarme!

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo de felicidad.

A mi familia y amigos, por el amor y el apoyo en cada momento.

A mis compañeros de clase de la Universidad de Carabobo, por sus enseñanzas.

A los estudiantes del 5to año de medicina, de la escuela José María Vargas de la UCV, y a mi colega Licda. Michelle García por colaborar en la toma y en el procesamiento de las muestras.

A mis tutores Esp. Hiorley Almaral y a el Msc. Joceba Celaya, por haber creído en mí, haberme tenido la paciencia necesaria y por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS JURÍDICAS Y POLÍTICAS
ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA



**DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL SEXO MEDIANTE EL GEN DE
LA AMELOGENINA DE APLICACIÓN FORENSE, EN UNA
MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE CARACAS, VENEZUELA**

Autor: Lic. Rosneld Rivero

Tutor: Esp. Hiorley Hear

Campus Bárbula, Diciembre de 2017

RESUMEN

En Venezuela, las experticias del ADN se iniciaron en 1970, únicamente en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), sin embargo, su aplicación en la solución de casos judiciales se inició en 1985 y desde entonces es posible determinar con certeza, en los casos en que hay material genético, la autoría de un hecho punible. Existen diversas metodologías que no han sido validadas en nuestro país, tal es el caso del estudio del gen de la amelogenina, que tiene dos copias, una en el cromosoma X, *AMELX*; y otra en el cromosoma Y, *AMELY*; encontrándose divergencias en secuencia y tamaño entre los alelos codificados en el cromosoma X y Y, siendo esta la base que ha permitido su amplia utilización en ciencias forenses para el diagnóstico genético del sexo. En hembras con cariotipo (XX), el sistema de electroforesis mostrará una sola banda o un sólo pico, mientras que en varones (XY) mostrará dos bandas o dos picos. Puede ocurrir un alelo *AMELX* nulo (no amplifica) pero el resultado seguirá siendo un femenino correcto o un masculino con una sola banda Y, pero un alelo *AMELY* nulo será interpretado como falso femenino. En este trabajo se buscarán alelos nulos en el cromosoma Y, en una muestra de población masculina de Caracas-Venezuela, para estimar su frecuencia y calcular el error típico, puesto que la identificación del sexo en un asunto penal es importante para la investigación.

Palabras Claves: Genética Forense, Criminalística, Identificación, Cromosomas Sexuales.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ACTA DE APROBACION DEL PROYECTO	i
CONSTANCIA DE ACEPTACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORIZACIÓN DEL TUTOR	iii
INFORME DE ATIVIDADES	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN	vii
INDICE GENERAL	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
EL PROBLEMA	4
OBJETIVOS	6
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	7

CAPITULO II

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN 10

MARCO TEÓRICO 14

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO 36

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS 44

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENADACIONES 52

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55

ANEXOS 59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Marcadores Genéticos del CODIS	3
Figura 2. Electroferograma típico	14
Figura 3. Organización del Genoma Humano	18
Figura 4. Representación Esquemática del los Cromosomas Sexuales X y Y	24
Figura 5. Cariotipo Normal Humano	26
Figura 6. Representación Esquemática del Gen de la Amelogenina	28
Figura 7. Producto de Amplificación del Gen <i>AMEL</i> en un Gel de Poliacrilamida al 8%	29
Figura 8. Distribución en la Composición Genética de la Población Venezolana	34
Figura 9. Ficha de Registro de Datos	37
Figura 10. Extracción de ADN genómico	38
Figura 11. Precipitación del ADN.	39
Figura 12. Corrida rápida en gel de agarosa 1%	44
Figura 13. Geles de acrilamida 10%	45
Figura 14. Gel de acrilamida 10%	47
Figura 15. Gel de acrilamida 15%	47
Figura 16. Estandarización de la prueba DYZ3. Gel acrilamida 12%	48
Figura 17. Gel acrilamida 15%	49

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Homología existente entre los genes	27
Tabla 2. Distribución de la frecuencia del gen <i>AMELY</i> nulo, en distintas poblaciones	32
Tabla 3. Detalle de los primers específicos para el gen de la Amelogenina	40
Tabla 4. Condiciones del termociclador para la PCR	41
Tabla 5. Detalle de los primers específicos para el cromosoma Y	43

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMELX	Gen <i>AMEL</i> ubicado en el cromosoma X
AMELY	Gen <i>AMEL</i> ubicado en el cromosoma Y
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
pb	Pares de Base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
°C	Grados Centígrados
μL	Microlitros
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
STR	Short Tandem Repeat
mL	Mililitros
μM	Micromolar
M	Molar

INTRODUCCIÓN

La Genética Forense es la ciencia que se basa en el estudio de la variabilidad genética, como medio de identificación de individuos, para así ser capaz de resolver, entre otros, casos de investigación biológica de parentesco y criminalística.

La experiencia acumulada en el análisis molecular de enfermedades ligadas al sexo mediante estudios de marcadores del cromosoma X y Y en Genética Clínica, ha promovido que los laboratorios de Genética Forense comiencen a utilizar estos marcadores para la identificación de individuos.

La identificación del sexo a partir de una muestra de ADN obtenida de cualquier fuente biológica, bien sea sangre, pelos, saliva, restos óseos, fluidos corporales, entre otros; mediante el test de la amelogenina tiene un interés crucial en el ámbito de la medicina forense (Francés y col., 2008).

El gen que codifica esta proteína tiene dos copias, una en el cromosoma X conocida como *AMELX*, y otra en el cromosoma Y, *AMELY*; encontrándose divergencias en secuencia y tamaño entre los alelos codificados en el cromosoma X y el cromosoma Y, siendo esta la base que ha permitido su amplia utilización en ciencias forenses para el diagnóstico genético del sexo.

Las diferencias detectadas en las secuencias de las dos copias del gen (*AMELX* y *AMELY*), se aprovecharon para desarrollar un marcador genético del sexo, de un sólo paso por PCR (Nakahori, 1991; Akane, 1992; Sullivan, 1993) y desde entonces ha mejorado mucho el conocimiento de las características del gen; el análisis simultáneo de estos dos genes es de gran utilidad en la identificación del sexo a partir de indicios biológicos, esto reviste de una gran importancia en las ciencias forenses, debido a que el diagnóstico del sexo es crucial en la investigación criminal.

No obstante, en los últimos años, se han comunicado fallos de esta técnica en determinados individuos, que pueden llevar a un diagnóstico erróneo del sexo, con las consecuencias que este hecho puede tener en la investigación llevada a cabo.

Los laboratorios especializados en pruebas de identificación genética forense, utilizan universalmente kits comerciales con marcadores autosómicos tipo STR, (por su acrónimo en inglés de *Short Tandem Repeat*), secuencias repetidas en tándem, híper variables y con herencia mendeliana; adicionalmente se utiliza un marcador de los cromosomas sexuales (Gen *AMEL*) para la identificación de género, son sistemas de PCR Multiplex, presentados en la figura 1.

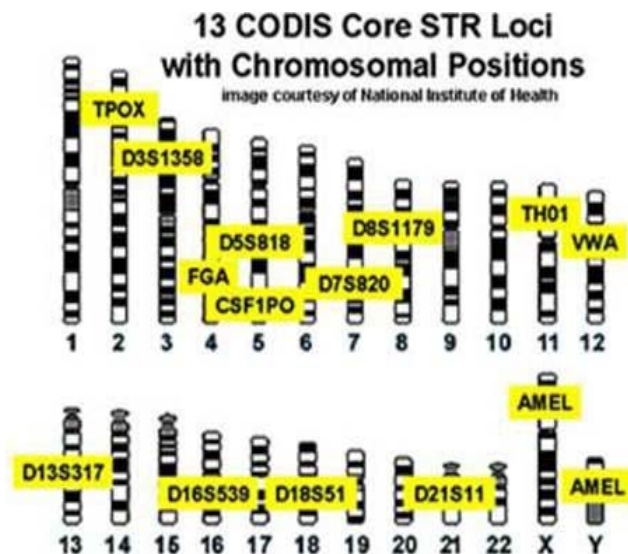


Figura 1. Marcadores genéticos del CODIS (Combined DNA Index System); se muestran 13 loci STR propuestos por el FBI (Federal Bureau of Investigation) pertenecientes a la base de datos nacional de ADN en USA; los marcadores se analizan en kits multiplex comerciales de cuantificación genética, entre ellos se encuentra como marcador de los cromosomas sexuales: *AMELX* y *AMELY*. En la actualidad estos marcadores de identificación genética se han ampliado y son de uso universal. Existe un estándar similar europeo, sin embargo los kits comerciales modernos traen una combinación de ambos estándares. (Imagen tomada <http://www.fbi.gov/>).

Los avances de la tecnología y la ciencia van de la mano, siendo cada día mucho más importantes en los estudios de criminalística para resolver diferentes casos, el estudio del cromosoma Y presenta más interés en los temas forenses para hallar diferentes incógnitas sobre asuntos de paternidad y de abusos sexuales.

Dada la amplísima utilización del gen de la amelogenina en el ámbito forense, el objetivo es describir las posibles fuentes de error de este marcador sexual, en una determinada muestra en la población de Caracas, Venezuela y así no conducir a atribuciones espurias del sexo en los participantes de este estudio.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El análisis de marcadores autosómicos y sexuales se emplean fundamentalmente en el campo de la Genética Forense con el objetivo de obtener perfiles genéticos para resolver casos de criminalística o de parentesco.

Sin embargo, la eficacia de los marcadores sexuales se ve reducida en la resolución de determinados casos, debido a fallos con los marcadores sexuales, como el gen de la amelogenina, con las consecuencias que este hecho puede tener en la investigación judicial. En estos casos, se hace necesario el análisis poblacional de los individuos mediante herramientas basadas en el análisis de STRs del cromosoma Y con el fin de determinar si existen mutaciones, que puedan arrojar falsos femeninos.

En relación a lo planteado, es necesario aclarar que el gen de la amelogenina no ha sido validado a gran escala en la población venezolana, es por ello que no sabemos si existen individuos con mutaciones en este gen, capaces de provocar una clasificación errónea del sexo. Asimismo, la existencia de una subestructura poblacional dentro de una misma población puede influir en la predisposición de mutaciones en estos marcadores sexuales, por lo que disponer

de los datos de las frecuencias alélicas y haplotípicas de los marcadores del cromosoma Y de diferentes grupos, permite hacer una correcta interpretación de este tipo de análisis complejos en las pruebas de identificación, en casos de interés judicial.

Es a partir del análisis precedente que surge la necesidad de establecer las siguientes interrogantes:

- ✓ ¿En una muestra de la población masculina de Caracas- Venezuela, existirán alelos *AMELY* nulos?
- ✓ ¿Sera posible estimar la frecuencia y calcular el error típico, en caso de hallar alelos *AMELY* nulos?
- ✓ ¿Qué importancia forense posee el estudio del Gen de la Amelogenina, como marcador genético del sexo?

Para responder a todas estas interrogantes, se hace indispensable realizar un estudio en una muestra representativa de la población de Caracas para estudiar el gen de la Amelogenina, de aplicación forense, e identificar alelos *AMELY* nulos en caso de que existieran mediante el uso de técnicas de biología molecular.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar el gen de la Amelogenina, de aplicación forense, en una muestra de la población masculina en Caracas -Venezuela, e identificar alelos *AMELY* nulos en caso de que existieran.

Objetivos Específicos:

- ✓ Identificar el sexo de la población masculina en estudio, mediante la PCR con los oligómeros S1 y S2 propuestos por Sullivan.
- ✓ Determinar el sexo de aquellas muestras en las que se hallará discrepancia entre el sexo conocido y el sexo identificado (*AMELY* nulo), mediante PCR con marcadores alternativos.
- ✓ Estimar la frecuencia y calcular el error típico, en caso de hallar alelos *AMELY* nulos.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los kits de identificación genética forense comerciales sólo se han estado utilizando en la práctica desde hace unos pocos años y muy limitadamente. Los marcadores genéticos forenses (STRs) y el gen de la amelogenina no han sido validados a gran escala en la población venezolana. No sabemos si dentro de nuestra población se hallan grupos en los que existan mutaciones capaces de provocar que un porcentaje de sus individuos pudieran ser erróneamente clasificados como femeninos en lugar de masculinos.

En este sentido, según Sanz, establece que la identidad de la persona consiste en ser quien es y no otra (Sanz, 2002); termino relacionado con los principios fundamentales que sustentan la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela (Título I, II, III), haciendo énfasis en los aspectos relacionados con la ciudadanía, deberes, derechos y garantías.

Artículo 56.- *Toda persona tiene derecho a un nombre propio, al apellido del padre y al de la madre y a conocer la identidad de los mismos. El Estado garantizará el derecho a investigar la maternidad y la paternidad. Toda persona tiene derecho a ser inscrita gratuitamente en el registro civil después de su nacimiento y a obtener documentos públicos que comprueben su **identidad biológica**, de conformidad con la ley. Éstos no contendrán mención alguna que califique la filiación.* (CRBV, 1999).

Al respecto, la Sala Constitucional del Tribunal Supremo de Justicia el 14 de agosto de 2008 con ponencia de la Magistrada Luisa Morales, al referirse al derecho a la identidad de los ciudadanos, considera que es un derecho inherente a la persona humana y del cual no se puede prescindir, lo cual genera paralelamente una obligación al Estado, consistente en el deber de asegurar una identidad legal, la cual debería coincidir con la identidad biológica, todo ello con la finalidad de otorgar a todo ciudadano un elemento diferenciador con respecto a los integrantes de una sociedad, el cual se interrelaciona y se desarrolla con el derecho al libre desenvolvimiento de la personalidad.

En este mismo orden de ideas, debe destacarse que el artículo 4 de la Ley Orgánica para la Protección de Niños, Niñas y Adolescentes (L.O.P.N.A.), establece una obligación general del Estado de adoptar todas las medidas administrativas, legales y judiciales que sean necesarias y apropiadas para asegurar a todos los niños y adolescentes el pleno disfrute de sus derechos y garantías, entre los cuales se encuentra el derecho a la identidad.

Es por estas razones que el Estado se encuentra obligado no sólo en el plano nacional sino internacionalmente, en diversos tratados internacionales suscritos y ratificados por Venezuela, a garantizar el respeto y resguardo del derecho a la identidad, como implícito al desarrollo del ser humano dentro de la sociedad y como elemento definidor de su conducta y desarrollo individual, consagrados los mismos en los artículos 19 de la Convención Americana de los

Derechos Humanos, 24.2 del Pacto Internacional de Derechos Civiles y Políticos, y el Principio 3° de la Asamblea General de las Naciones Unidas, así como en los artículos 16, 17, 18, 19, 21 y 22 de la Ley Orgánica para la Protección de Niños, Niñas y Adolescentes (L.O.P.N.A, 1998).

Por último, hace unos años el Ministerio Público inició una campaña de identificación de unas personas fallecidas en un suceso ocurrido en Caracas en el año 1989, denominado “El Caracazo”, y que fueron sepultados en una fosa común en el Cementerio General del Sur. En el transcurso de la investigación surgió una discrepancia de opinión entre los antropólogos y los genetistas, los primeros tenían la osamenta de un individuo que identificaron como masculino, mientras los especialistas en genética le identificaban como femenino. Un asesor del Ministerio Público consultó a el Laboratorio de Patología Molecular del Instituto Anatomopatológico, de la UCV, cómo se podría resolver esta discrepancia, (comunicación personal, Msc. en Criminalística Rafael Aguilar). A raíz de esta consulta se inició esta línea de investigación, que tiene como finalidad generar un aporte importante en el desarrollo de investigaciones forenses y criminalísticas en Venezuela.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

La Genética Forense es una especialidad de la Genética que incluye un conjunto de conocimientos de genética necesarios para resolver ciertos problemas jurídicos. Los tipos de pericia más solicitados al laboratorio de Genética Forense por los tribunales son casos de investigación biológica de la paternidad, pericias de criminalística biológica (estudio de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre, esperma, pelos, etc.) y, finalmente problemas de identificación.

La Genética Forense basado en los análisis del ADN puede ser datado en el año 1985, cuando Alec Jeffreys descubrió la existencia de unas regiones hipervariables dispersas en el genoma humano, que al ser tratadas con enzimas de restricción, mediante la técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), generaban fragmentos de longitud variable (Jeffreys y col., 1985). La diferencia de longitud se debía a que estas regiones estaban constituidas por un determinado número de repeticiones en tándem, el cual variaba de unos individuos a otros. Así mismo, Jeffreys describía un método de identificación individual conocido con el nombre de huella genética (ob. cit). En abril de ese mismo año, se resolvía satisfactoriamente, en Inglaterra, un caso de

inmigración por medio de esta técnica y muy poco después fue aplicada en un caso de homicidio (op. cit).

En Venezuela, las experticias del ADN se iniciaron en 1970, únicamente en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). A partir de 1980 se fueron creando los laboratorios de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, de la Universidad del Zulia (LUZ), el Cuerpo de Investigaciones Científicas, Penales y Criminalísticas (CICPC), la Guardia Nacional Bolivariana y el Ministerio Público. Estos procesan evidencias físicas y biológicas colectadas en el sitio del suceso (prenda íntima, sangre, arma de fuego, entre otras) y evidencias obtenidas en el laboratorio, como el hisopado bucal, vaginal o rectal. Así mismo, realizan peritajes para identificar a una persona; actúan en casos relacionados con desapariciones forzadas, homicidios, delitos sexuales o accidentes aéreos y establecen la filiación heredo-biológica, en asuntos de índole civil por impugnación o inquisición de paternidad y maternidad.

La prueba pericial en materia de Genética Forense ha servido para la administración y aplicación de Justicia en diversas latitudes y Venezuela no es la excepción. Esta prueba en nuestro sistema de justicia, está revolucionando la forma en la que se aplicaban los procedimientos criminalísticos y en la que los jueces interpretan la prueba pericial, ya que al tratarse de una prueba vinculante ofrece el medio necesario para que se identifique con una certeza científica el

perfil genético de un presunto responsable en un delito contra la libertad sexual o se determine de manera específica la relación biológica de parentesco de tipo paternidad entre un supuesto padre y un supuesto hijo.

Desde una aplicación forense, este perfil genético puede utilizarse para dos aplicaciones fundamentales: la determinación biológica de parentesco o la identificación humana en investigaciones judiciales. La primera de ellas, establece que la constitución genética de un individuo es resultado de la herencia genética obtenida de los progenitores, por lo que la perfilación genética nos ayuda a establecer cuál de esos dos marcadores tiene un origen paterno y el otro materno. En el caso de la identificación, la total correspondencia del perfil genético de un sospechoso con el perfil genético de un indicio recuperado en el lugar de los hechos debe ser total para cada marcador genético analizado y comparado.

Debido a que el ADN se puede encontrar prácticamente en cualquier sustrato biológico que contenga células (excepto los eritrocitos); los procedimientos en el laboratorio han cambiado de tal forma que es posible realizar la obtención de un perfil genético de identificación de elementos encontrados en el lugar de los hechos tales como colillas de cigarros, gomas de mascar, gotas pequeñas de sangre, cabellos, rastros de semen, manchas de saliva, etc.

Sin embargo, se han comunicado fallos en algunos marcadores genéticos, tal es el caso del marcador sexual de la Amelogenina; descrito originalmente por Nakahori. Las diferencias detectadas en las secuencias de las dos copias del gen

AMEL, permitieron desarrollar un método de identificación del sexo, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El uso de un par de cebadores de una región homóloga en los cromosomas X y Y, resulta en fragmentos (amplicones) de diferentes longitudes, en el cromosoma X de 977 pb y en el cromosoma Y 788 pb (Nakahori, 1991).

En contraste, Sullivan (1993) desarrolló un protocolo de PCR que amplifica un segmento de las copias homólogas en los cromosomas X y Y del gen *AMEL* que igualmente generó amplicones de tamaños diferentes, pero de menor longitud.

Los amplicones de Nakahori X (977 pb) y Y (788 pb) son de gran longitud, lo que los hace inapropiados para su uso en kits comerciales de identificación genética forense actuales, ya que en estos multiplex los marcadores utilizados son STR que generan amplicones de menor longitud, por ello hoy se utilizan universalmente los cebadores desarrollados por Sullivan, que generan amplicones más pequeños X (106 pb), Y (112pb) que están dentro del rango de tamaños de los amplicones de los marcadores autosómicos de los kits comerciales.

Algunos estudios han reportado mutaciones en los cromosomas X y Y, que afectan el gen *AMEL* y pueden causar fallos en los amplicones de *AMELX* o *AMELY*, resultando en una incorrecta identificación del sexo, como se muestra en la figura 2, presentada a continuación. (Santos, 1998; Roffey, 2000; Thangara,

2002; Chang,2003; Shadrach, 2004; Lattanzi, 2005; Kashyap, 2006; Mark, 2007; Xueling, 2012).

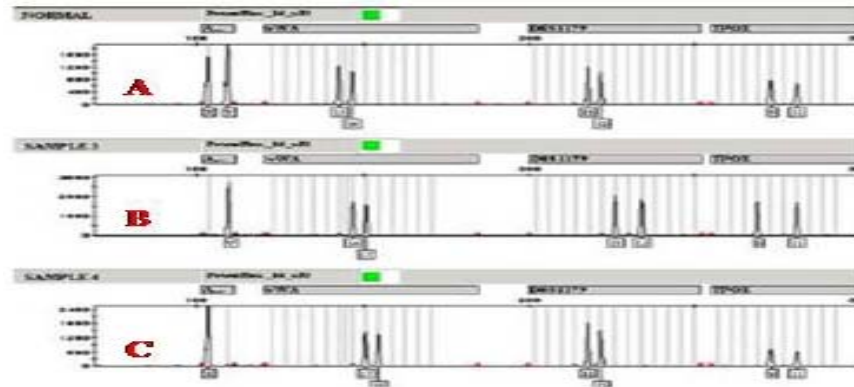


Figura 2. Electroferograma típico, Amplificación del marcador sexual del gen de la Amelogenina: (A) muestra de un varón normal, (B) un varón con un alelo nulo *AMELX*, (C) un varón con un alelo nulo *AMELY*. (Imagen tomada de Xueling, 2012).

El uso de las metodologías de Identificación Genética Forense han sido muy limitadas en nuestro país, por esta razón no se han realizado estudios donde se haya reportado la existencia de alelos *AMELY* nulos. Por ello con este trabajo se pretende iniciar el estudio de las características del gen *AMELY* en la población venezolana, debido a que actualmente, la Genética Forense considera al estudio de las regiones variables del ADN como su herramienta principal para la obtención de la información genética individual, y esto reviste de gran ayuda en el esclarecimiento de algún hecho delictivo.

BASES TEÓRICAS

La criminalística es una ciencia que consiste en analizar el estudio de las evidencias físicas y va dirigida a la reconstrucción de los hechos, por lo tanto

aporta información de interés a las autoridades que tienen la función de administrar la justicia. Para el análisis y el estudio de las evidencias físicas halladas en el sitio del suceso, la criminalística se acoge en el uso de sus tres ciencias fundamentales, como lo son la biología, la física y la química.

Estos análisis se realizan en los laboratorios especializados, no basta coleccionar las evidencias físicas del sitio del suceso a través de la criminalística de campo sino que, una vez en poder del organismo de investigación, debe ser trasladado a un laboratorio y es este quien va a realizar todo el conjunto de procedimientos de verificación científica. El laboratorio de pericias tiene como función realizar la verificación científica de la evidencia física coleccionada en el sitio del suceso, estas pueden ser evidencias tangibles o intangibles o biológicas y no biológicas.

En el caso de nuestra investigación, el estudio se fundamenta en evidencias físicas de tipo biológicas, debido a que el ADN (ácido desoxirribonucleico) se encuentra en el núcleo de todas las células de los seres vivos. Sin embargo, se sabe que existe una porción de ADN mitocondrial. Esta característica es de suma importancia, debido a que en todo sitio del suceso donde exista un contacto humano bajo aquel principio de la criminalística denominado principio de intercambio o principio de Locard el cual plantea la interrelación entre la víctima, autor, sitio del suceso, medios de comisión, es decir, el tetraedro de la criminalística que interrelaciona estos factores con las características de las

evidencias físicas involucradas o encontradas y va a producir traslado, transferencia, intercambio de la evidencia de uno de esos factores al otro. El intercambio se produce por las características de adhesividad de la propia evidencia que permiten que se adhiera; por eso podemos encontrar, por ejemplo, cabellos de la víctima, fluidos biológicos como sangre, semen, saliva, y secreciones, en la ropa del victimario.

El Estudio del ADN en estas evidencias biológicas es de suma importancia en el campo de la criminalística porque permite individualizar, a la hora de que se cometa un hecho punible. Con referencia a lo anterior, es importante mencionar que el ADN se compone de dos cadenas, cada una formada por nucleótidos. Cada nucleótido, a su vez, está compuesto por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. Estas últimas son cuatro: adenina (A), timina (T), citosina (C), y guanina (G), y siempre una A se enfrenta a una T y una C se enfrenta a una G en la doble cadena, esta molécula conforma el genoma de todos los seres vivos.

La base de la herencia genética humana son los cromosomas, unas gigantescas hebras de ADN en las que están escritas nuestras características biológicas. De estos cromosomas, tenemos los humanos un total de 46; 23 se reciben del padre y los otros 23 de la madre, siendo sólo dos cromosomas los que determinaran el sexo de un individuo, denominándose “cromosomas sexuales” y pueden ser X o Y. Como recibimos un cromosoma sexual de nuestro padre y otro

de nuestra madre, las combinaciones finales, independientemente de qué progenitor nos lo transmita, sólo pueden ser XX o XY, siendo así la combinación XX la que determina el sexo femenino y la combinación XY el sexo masculino.

Organización del genoma humano

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética. El Genoma Humano haploide está formado por 3×10^9 pares de bases (Fowler y col., 1988); y según la función biológica que desempeñe, el ADN se puede clasificar en:

1. **Secuencias codificantes y reguladoras:** Las regiones que codifican y regulan la síntesis de proteínas se llaman genes. Luego que fue culminada la secuenciación del genoma humano se estima que contiene de 20.000 a 25.000 genes. Un 25% del genoma está relacionado con secuencias génicas pero de este porcentaje sólo el 1,5% codifica proteínas y el restante 23,5% está envuelto en regulación de genes lo que incluye secuencias promotoras, *enhancers* (potenciadores), represores, señales de poliadenilación. En su mayoría estas secuencias están constituidas por intrones, pseudogenes y fragmentos de genes (Jasinska, 2004).
2. **Secuencias no codificantes y extra génicas:** El 75% del genoma humano es secuencia extragénica, de la cual 21% es de copia única cuya función aún permanece desconocida y el restante 54% son secuencias repetidas, de

estas, el 45% representa a secuencias repetidas intercaladas (separadas por segmentos de secuencia única), dispersas por el genoma y el restante 9% consiste de secuencias repetidas en tándem compuesto por Satélites, Minisatélites y Microsatélites (Jasinska, 2004). Este tipo de ADN, al no estar sujeto a presión selectiva tan intensa soporta mayores niveles de variación entre individuos, por lo que tiene gran interés en identificación humana, en particular en el campo de las ciencias forenses (Venter y col., 2001).

A su vez, el ADN no codificante se puede clasificar en:

1. **ADN de copia única:** formado por secuencias representadas una o pocas veces en el genoma (Jorde, 2011).
2. **ADN de copia múltiple:** formado por secuencias repetitivas denominadas unidades de repetición, cuyo número de copias de estas unidades varía desde un mínimo de mil veces (ADN moderadamente repetitivo) hasta millones de veces (ADN altamente repetitivo) en el genoma (Venter y col., 2001; IGHSC, 2004). Se clasifican a su vez, en función de su disposición a lo largo del genoma y del tamaño de la unidad de repetición en dos grupos:

A. **ADN repetitivo disperso:** las unidades que se repiten aparecen intercaladas o dispersas a lo largo del genoma. Se distingue los LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*), SINEs

(Short Interspersed Nuclear Elements), LTR (Long Terminal Repeats), y transposones de AND (Fowler y col., 1988; Smit, 1999).

B. *ADN repetitivo en tándem*: las unidades que se repiten aparecen agrupadas con una secuencia común de nucleótidos repetida de manera consecutiva. Según el número de nucleótidos que forman las unidades de repetición de estos fragmentos y el número de veces que se repiten estas unidades, podemos distinguir: ADN satélite, minisatélites o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) y los microsatélites o STRs (*Short Tandem Repeats*) (Jeffreys y col., 1985; Venter, 2001).

A continuación, en la figura 3 se muestra el esquema general de la organización del genoma humano

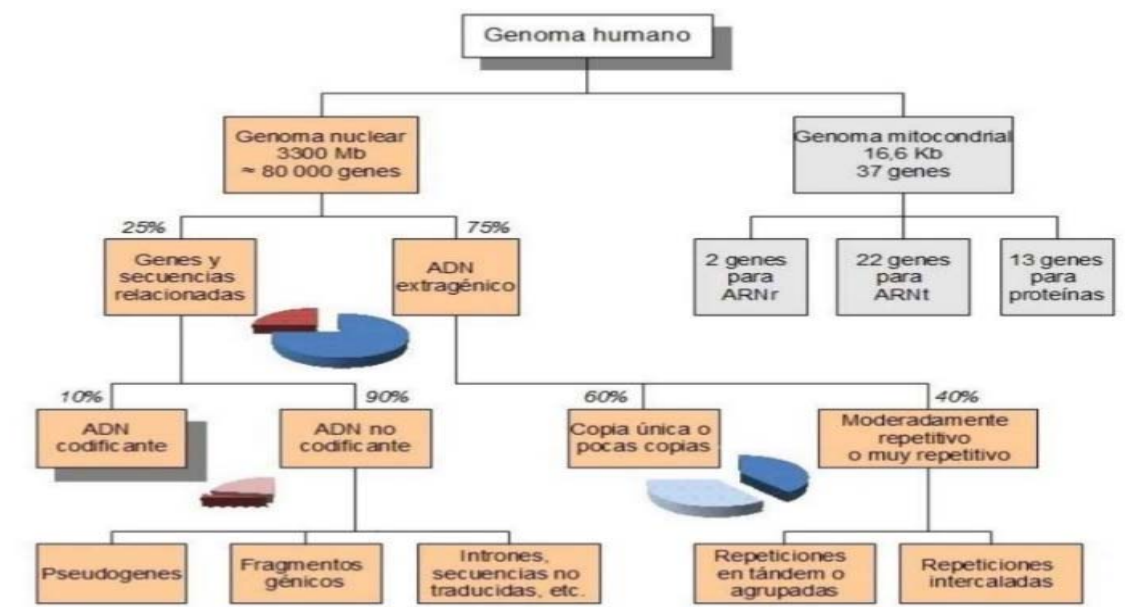


Figura 3. Visión general de los distintos tipos de secuencias que constituyen el genoma humano.

Una primera clasificación del genoma humano distingue, por un lado, los genes y secuencias relacionadas con genes (exones, intrones, regiones no traducidas que contienen elementos reguladores, etc), y por otro todo el ADN que está entre los genes, llamado ADN extragénico o “de relleno” y que no codifica ninguna proteína ni contiene ningún elemento funcional. Nótese, la mayor parte del genoma humano (un 75%) está formada por este último, de forma que sólo un 25% del genoma humano incluye secuencias relacionadas con genes. Lo más sorprendente es que de este 25% sólo un 10% está constituido por ADN codificante (exones), siendo el resto ADN no-codificante asociado a genes. Por tanto, resulta que sólo un 1,5-2% del total del genoma humano es ADN codificante. El ADN extragénico está formado, sobre todo, por los componentes repetitivos del genoma humano, aunque también hay secuencias únicas o en bajo número de copia

ADN Microsatélite en Genética Forense

Los microsatélites o STRs son segmentos de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. El análisis de estos, ha permitido establecer que son elementos extraordinariamente útiles en la identificación humana y en el mapeo genético, debido a su elevado polimorfismo (gran poder de discriminación), tasa de mutación relativamente baja, tamaño pequeño y ubicación cromosómica establecida. Además, varios de estos marcadores pueden amplificarse mediante PCR de forma simultánea (multiplex).

Los STRs generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN, y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos y por tanto, que sean usados en el campo de la Genética Forense; es por ello que la combinación de estos marcadores es la base de los bancos de datos para almacenar la información, tal y como lo es la base de datos empleada por el FBI, denominada CODIS, esta utiliza un conjunto estándar de 13 regiones de STRs específicos y obligatoriamente posee el marcador sexual de la amelogenina.

Sin embargo, aun cuando los marcadores STRs son actualmente los más informativos para las pruebas forenses, ahora se ha comenzado a trabajar con el mejoramiento de éstos para muestras sumamente degradadas. La técnica se basa en un simple cambio en la posición de las sondas (primers) para la amplificación de los loci de STRs, éstos se posicionan más cerca del inicio de la repetición en tándem, lo que genera un producto mucho más pequeño (Mulero y col., 2008). Como ejemplo, ya se han aceptado 3 nuevos miniSTRs (D10S1248, D14S1434, D22S1045) como loci estándar en el Interpol Europeo (Gill y col., 2006).

Los microsatélites son polimorfismos compuestos por unidades de repetición de 2-7 pb repetidas en tándem de 3 a 50 veces, distribuidos ampliamente en el genoma en secuencias de longitudes menores en general a 400pb. (Gill, 2002). Las secuencias de STRs pueden variar en el tamaño de la unidad de repetición, en el número de veces que se repite la unidad y en las características del patrón de repetición.

En cuanto al patrón de repetición los STRs, se clasifican en: STRs simples, compuestos por repeticiones con unidades idénticas en longitud y secuencia; STRs compuestos, con dos o más tipos de unidades de repetición; STRs complejos, compuestos por varios bloques de unidades de repetición de longitud variable e intercaladas con otras secuencias variables (Urquhart y col., 1994); y STRs hipervariables compuestos, los cuales poseen alelos no consenso que van a diferir tanto en la secuencia como en el tamaño (Gill y col., 1997).

Estos polimorfismos se pueden encontrar tanto en los cromosomas autosómicos, como en los cromosomas sexuales X y Y.

La literatura internacional, reporta que entre los criterios de selección de los microsatélites o STRs con aplicación en los análisis de identificación humana y relaciones de parentesco, en casos forenses, destacan los siguientes:

- ✓ ***Elevado poder de discriminación y heterocigosidad:*** el poder de discriminación determina la capacidad de dicho marcador o conjunto de marcadores para diferenciar genéticamente a individuos no relacionados tomados al azar. Por otra parte, la heterocigosidad, es la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomado al azar de la población sean distintos. Cuanto mayores sean estos valores, mayor será la capacidad de identificación de este marcador, siendo aconsejable un poder de discriminación no inferior al 90% y una heterocigosidad superior al 70% (Carracedo y Lareu; 1998).
- ✓ ***Localización cromosómica diferente:*** uno de los requisitos es que se asegure una selección de loci que segreguen independientemente y no como grupo de ligamiento, de tal manera que se pueda aplicar la regla del producto en los cálculos estadísticos de probabilidad de coincidencia al azar (Butler, 2006). Para ello, se buscan loci que se encuentren en distintos cromosomas o distantes entre sí en el mismo cromosoma.
- ✓ ***Baja tasa de mutación:*** juega un papel importante en los casos de investigación biológica de parentesco, debido a que estas mutaciones pueden

provocar la interpretación de falsas exclusiones. En los casos de criminalística, este criterio no es tan importante, puesto que las mutaciones tienen lugar en las células germinales y son mantenidas durante toda la vida del individuo (Butler, 2006; Gonzalez y col., 2009).

✓ **Bajo porcentaje de bandas tartamudas:** El deslizamiento de la polimerasa, es el responsable de que se generen bandas tartamudas, que van a ser productos alélicos que se diferencian del alelo asociado tan sólo por una unidad de repetición. La producción de bandas tartamudas supone una desventaja para la correcta interpretación de los análisis de mezclas, ya que estos picos pueden confundirse con alelos reales. La altura de estos picos es normalmente inferior a un 10-15% de la altura del pico del alelo real (Gill y col., 2006). La aparición de estos artefactos se produce con mayor frecuencia en los STRs con unidades de repetición más cortas, como los dinucleótidos y trinucleótidos, y con una menor frecuencia en las unidades de repetición más largas, como los pentanucleótidos y hexanucleótidos, por otra parte menos frecuentes en el genoma.

✓ **Rango alélico reducido:** los tamaños de los alelos, se recomiendan que estén comprendidos entre 90-500 pb, para asegurar buenos resultados en muestras con ADN degradado (Butler, 2006).

Cabe señalar que las repeticiones tetranucleótidas son las que más se ajustan a estas características y de esta manera son las más utilizadas en Genética Forense.

ADN Microsatélite del Cromosoma X y Y en Genética Forense

La experiencia acumulada en el análisis molecular de enfermedades ligadas al sexo mediante estudios de marcadores del cromosoma X y Y en Genética Clínica, ha promovido que los laboratorios de Genética Forense comiencen a utilizar estos marcadores para la identificación de individuos.

Estos análisis se basan en el hecho de que los hombres transmiten una copia del cromosoma X o una copia del cromosoma Y, en ausencia prácticamente de recombinación, a todos sus descendientes, por lo que, si éste sufre enfermedades genéticas, tales como la hemofilia, la distrofia muscular, la deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, el daltonismo, la infertilidad asociada al cromosoma Y o el síndrome de Jacobs, todos sus descendientes, al tratarse de enfermedades ligadas al sexo, heredarán el gen defectuoso localizado en el cromosoma X o Y, dependiendo del caso (Szibor, 2007).

Este contexto puede ser extrapolado a la Genética Forense y explicaría la utilidad del estudio de los microsatélites localizados en el cromosoma X y Y, en casos complejos de análisis de parentesco o de identificación del sexo, que no pueden resolverse con el estudio de marcadores genéticos autosómicos.

En humanos, el cromosoma X está exento de recombinación en la mayor parte de su longitud, a excepción de las zonas pseudoautosómicas PAR1, situada

en el extremo del brazo corto, de 2.6 Mb de longitud, y PAR2, situada en el extremo del brazo largo, de 0.32 Mb de longitud. Estas regiones contienen 14 y 4 genes, respectivamente, dentro de los cuales está el gen *AMEL* (Figura 4). Los varones transmitirán sin recombinación, el cromosoma Y a sus hijos, y el cromosoma X a todas sus hijas. De esta manera, todos los hermanos comparten el alelo del cromosoma Y, y todas las hermanas al menos un alelo por cada marcador del cromosoma X.

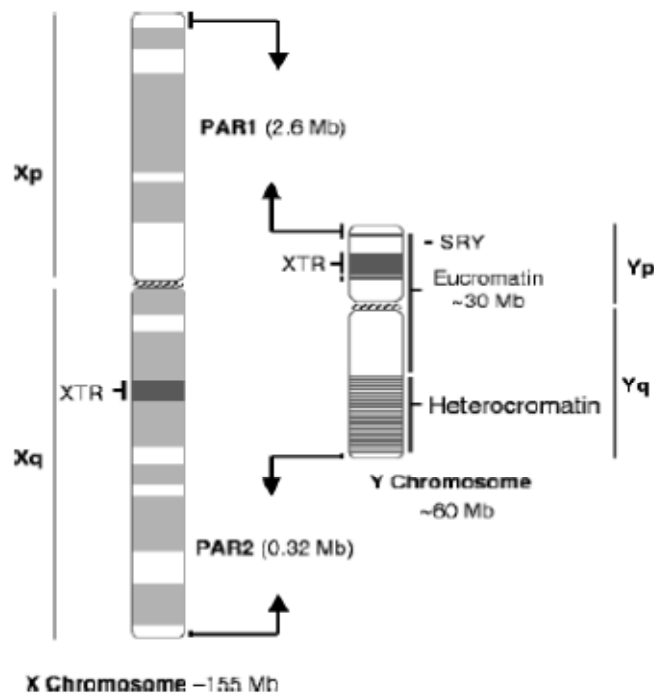


Figura 4. Representación esquemática de los cromosomas sexuales X y Y. A diferencia de los cromosomas autosómicos, los cromosomas sexuales no recombinan, por esta razón se han originado evolutivamente diferencias en las copias de los genes, como *AMEL*, presente en zonas pseudo-autosómicas (PAR1 y PAR2), estas zonas son restos de origen evolutivo de estos cromosomas, y sus regiones se mantienen en el tiempo por la ausencia de recombinación. En la figura se muestran regiones SRY (Sex Region of Y) y XTR (X Transposed Region).

Características y Evolución del gen *AMEL*

La amelogenina, esta codificada por el gen *AMEL* y fue descrita inicialmente por Slavkin y Boyde en 1975, de ser una proteína que forma la mayor parte de la matriz del esmalte dental durante el desarrollo del ser humano. Desde el punto de vista clínico, la deficiencia de amelogenina está relacionada con la amelogénesis imperfecta, una enfermedad hereditaria que afecta la formación del esmalte dental (Eastoe, 1996).

El gen *AMEL* fue ubicado en los cromosomas sexuales humanos por Lau en 1989, encontrando dos copias, una en el cromosoma X, ubicado en el locus Xp21, 1-Xp21,3 y una en el cromosoma Y, el cual mapea en Yp11,2. (Lau y col., 1989). El gen en ambas copias está formado por 7 exones y ambas codifican una proteína funcional, la amelogenina, que toma parte en la formación del material duro de los dientes y ha sido secuenciada totalmente en su composición de aminoácidos (Fichman y col., 1991). Se analizaron por electroforesis extractos de esta proteína y se encontró que existía una diferencia en los componentes de la proteína dependiendo del sexo del individuo de donde se tomaba la muestra. La proteína madura codificada en el cromosoma X pesa 19,8 KDal y está formada por 175 aminoácidos, mientras la codificada en el cromosoma Y tiene 176 aminoácidos y pesa 20 KDal. El residuo 29 (metionina) del producto codificado en el cromosoma Y no está presente en el producto codificado en el cromosoma X porque existe una delección de 3 pares de bases en esa copia.

En este sentido, el producto de amplificación obtenido mediante la separación electroforética en geles de acrilamida, usando los primers diseñados por Sullivan, es de 106 pb correspondiente a *AMELX* y 112pb por *AMELY*, identificando así el sexo del donante de la muestra. En hembras con cariotipo XX, el sistema de electroforesis que se utilice (geles de acrilamida planos o capilares) mostrará una sola banda o un solo pico, mientras que en varones (XY) mostrará dos bandas o dos picos muy cercanos.

Por otra parte, se piensa que los cromosomas sexuales se originaron a partir de un par de cromosomas autosómicos ancestrales que cesaron de recombinar hace 300 millones de años, acumulando diferencias entre ellos, dando origen a los cromosomas sexuales X y Y como los conocemos hoy día, como se evidencia en la figura 5 (Graves, 2002), lo que explica la existencia de genes homólogos en los cromosomas sexuales.

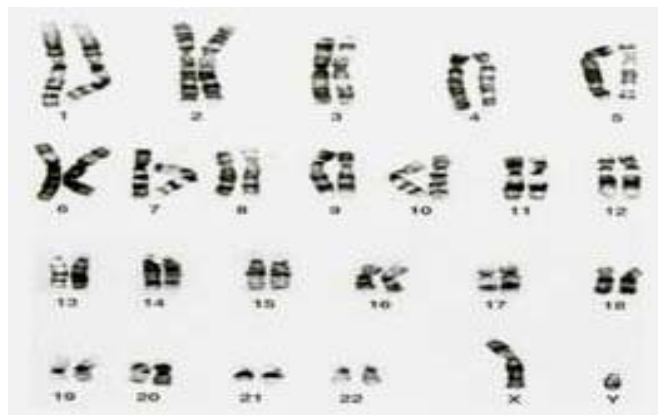


Figura 5. Cariotipo normal humano, en la imagen se muestra los cromosomas de un individuo masculino, ordenados por su tamaño, de mayor a menor. Cromosomas autosómicos (1 al 22) y la pareja de cromosomas sexuales X y Y.

La homología es una relación entre los rasgos debida a una ascendencia, un origen común. En la tabla número 1, presentada a continuación, se evidencia la homología existente entre los genes.

Tabla 1. Tipos de homología entre los genes.

Genes			
Ortólogos	Parólogos	Xenólogos	Gametólogos
✓ Evolucionaron luego de una división de linaje, como el gen del citocromo c en seres humanos y chimpancés.	✓ Se originan de una duplicación de un gen en la misma especie; que evolucionan hacia características diferentes, como los genes del alfa y beta- globina en los seres humanos.	✓ Se originan por transferencia lateral, entre diferentes taxones.	✓ Son genes homólogos en los cromosomas sexuales, que han surgido por el cese de la recombinación entre un par de autosomas ancestrales.

En referencia a los genes compartidos entre los cromosomas sexuales, dada su ascendencia común, es decir, que estaban representados por un único gen antes de que los cromosomas sexuales empezaran a divergir, se consideran homólogos, siendo específicos acerca de su origen, al no haber surgido por duplicación no son parólogos, de acuerdo con la definición usual de este término, descrita en la tabla 1. Para tipificar este tipo de homología, García Moreno y colaboradores acuñaron el termino gametólogo para denotar los genes homólogos en los cromosomas sexuales (Hans, 2000); es por ello que el gen de la amelogenina humano, es considerado como gametólogo.

Aplicación del gen Amelogenina de humano como marcador genético de sexo, en la genética forense.

Las diferencias detectadas en las secuencias de las dos copias del gen (*AMELX* y *AMELY*), se aprovecharon para desarrollar un marcador genético de sexo. En la siguiente figura, se encuentra la representación esquemática de las regiones de los genes *AMELX* y *AMELY*.

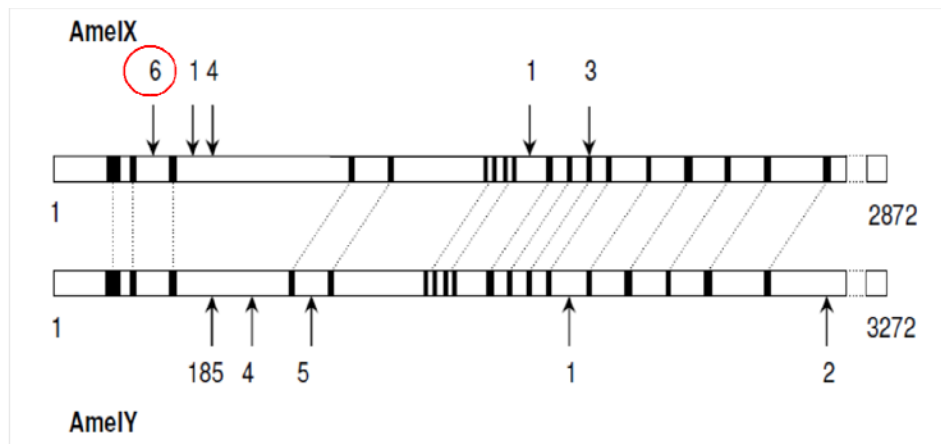


Figura 6. Representación esquemática de las regiones de homología y deleciones entre *AMELX* y *AMELY*. Las cajas en negro indican las regiones de homología absoluta entre los dos genes. Las deleciones están señaladas por flechas; las que se encuentran en la parte superior, señalan las deleciones presentes en *AMELX* y las flechas que se encuentran por debajo indican las deleciones presentes en *AMELY*. Los números en las flechas corresponden a la longitud en pb de la deleciones indicadas en cada gen.

La deleción de 6 pb señalada con una circunferencia roja, en la figura 6, se encuentra ubicada en el intrón 1 de *AMELX* y es la deleción en la cual flanquean

los oligómeros de Sullivan, que serán los utilizados principalmente en este estudio para la identificación de sexo.

Diversos trabajos de investigación se han realizado para la verificación de esta técnica, tal es el caso de Salvador en el año 2008 quien utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, para visualizar los amplicones generados por la PCR realizada con los oligómeros de Sullivan, para la identificación de sexo de una muestra de la población Sinaloa, México. Los resultados de este estudio se presentan en la figura 7, presentada a continuación.

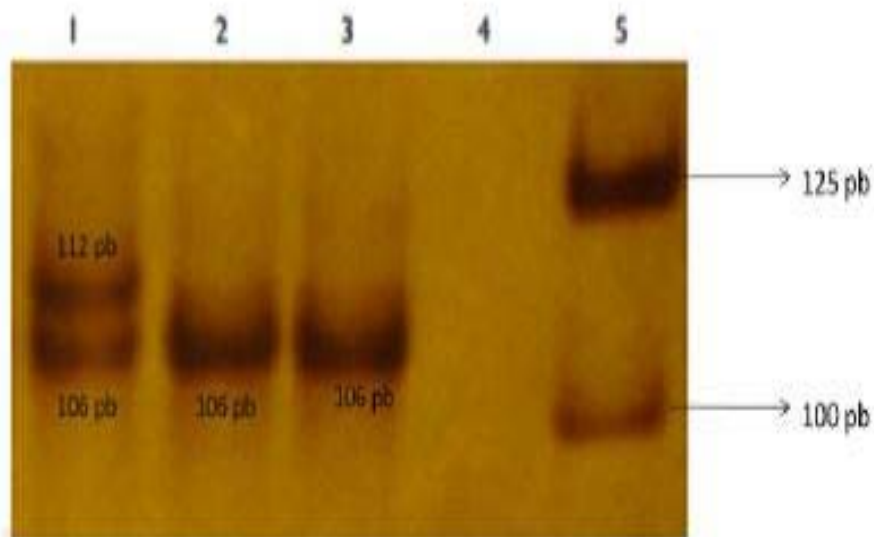


Figura7. Gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata, en cual se observa en el carril 1 dos bandas, una de 112 pb y de 106 pb, la presencia de dos bandas es indicativo de un masculino; en los carriles 2 y 3 una sola banda de 106 pb, indicando en estos casos individuos femeninos; carril 4 control negativo; carril 5 el marcador de peso molecular de 25 pb, donde observan las bandas de 100 pb y 125 pb. (Imagen tomada de Salvador, 2008).

Errores en el Sistema

AMEL NULO: Un alelo *AMEL* Nulo (*AMELX* o *AMELY*) ocurre cuando una mutación, puntual o deleción, impide que uno de los oligómeros hibride con su secuencia blanco, anulando la amplificación que identifica al cromosoma correspondiente.

Las muestras de origen femenino seguirán dando una señal correcta aun cuando una de las copias de *AMELX* no amplifique. Si ocurre lo mismo en varones, *AMELX* no amplifica, el resultado sigue siendo correcto, ya que amplifica *AMELY*. Sin embargo la falla en la amplificación de *AMELY* tendría como resultado una identificación incorrecta del sexo, lo cual sería muy grave si no se cuenta con otros indicios o evidencias que ayuden en la determinación del sexo en un caso legal.

La ausencia de un alelo X-específico es un caso raro pero que puede ocurrir. Igualmente es poco probable, pero puede ocurrir que mutaciones en las secuencias blanco de los oligómeros que se estén utilizando, los inhabilite de amplificar su región objetivo en *AMELY* (Santos, 1998; Roffey, 2000; Thangaraj, 2002; Chang, 2003; Lattanzi, 2005; Kashyap, 2006; Mark, 2007; Frances, 2008; Xueling, 2012), lo cual puede acarrear grave consecuencias en una investigación criminal, ya que en el caso de una muestra que sea

masculino con *AMELY* nulo, amplificara solo X y la identificación será incorrecta, arrojando un **“Falso Femenino”**.

Uno de los motivos que puede conllevar a una incorrecta identificación del sexo en el gen *AMELY* nulo, diversos estudios lo atribuyen a una mutación del cambio de nucleótido, de Citosina por Guanina, donde se une el iniciador reverso en el gen *AMELY* que interfiere y limita el uso de la prueba, ocasionando que los varones sean identificados como mujeres. (Steinlechner, 2002).

Las frecuencias reportadas en diferentes poblaciones del gen *AMEL*, para los países europeos y asiáticos como España, Inglaterra y China, son bajas, caso contrario sucede en la población de India y Sri Lanka, donde se reportan las mayores frecuencias de esta mutación (Chang, 2007; Xueling, 2012). En la tabla número 2, presentada a continuación, está tabulada la distribución de la frecuencia del gen *AMELY* para diferentes poblaciones.

Tabla 2. Distribución de la frecuencia de AMELY nulos en diferentes poblaciones.

<i>País</i>	<i>No de Nulos/ No de Individuos Estudiados</i>	<i>Frecuencia (%)</i>	<i>Referencias</i>
China	3/8.087	0,037	Xueling (2012)
India	5/270	1,852	Thangaraj (2002)
Australia	22/10.900	0,020	Mitchell (2006)
Malasia	11/315	3,490	Chang (2007)
Italia	1/13.000	0,008	Lattanzi (2005)
Inglaterra	2/2.000	0,100	Chang (2007)
España	1/1.000	0,100	Chang (2007)
Sri Lanka	2/24	8,333	Santos (1998)

Por tal motivo, expertos de Europa, Sudafrica, Asia y Estados Unidos; en una convección de Promega Corp en Estrasburgo en el 2014, presentaron kits modernos basados en la necesidad de desarrollar un estándar global de ADN, con muy alto poder de discriminación y compatible para los más de 40 millones de perfiles que hay en bases de datos de todo el mundo. Este sistema desarrollado por Promega incluye, además, 3 marcadores específicos de cromosoma Y, en adición al gen *AMEL* para evitar una asignación incorrecta del sexo en caso de que el donante sea portador de un *AMELY* nulo; lo que supone una herramienta de gran interés en el estudio de casos forenses relacionados con las agresiones sexuales perpetradas por varones y con el análisis genético de mezclas de fluidos biológicos.

El gen *AMEL* en la población Venezolana

La población mestiza venezolana, está compuesta por los aportes genéticos de las poblaciones europeas, africana e indígena. Existe un primer estudio donde se reporta un estimado de los porcentajes de aportes genéticos de las poblaciones que dan origen a la población mestiza venezolana, donde se refleja una predominancia del aporte europeo de 59%, seguido por el amerindio de 28% y en menos extensión el africano de 13% (Rodríguez y col., 2001).

El proceso de mezcla que da origen a la población mestiza venezolana comenzó en la colonia y continúa en el presente. Durante la colonia diversos factores favorecieron el cruce entre europeos masculinos e indígenas femeninas en mayor grado, seguido por el cruce de europeo con africano y en menor grado africano e indígena. Luego de la época colonial, la mezcla continuó y más intensamente durante el siglo XX, con una intensa inmigración española, italiana y portuguesa principalmente (Castro y col., 2011). Es por ello que el Dr Arias, estima mucho mayor en importancia la población indígena en nuestra composición genética en la actualidad. Estas consideraciones, se presentan a continuación en la figura 8.

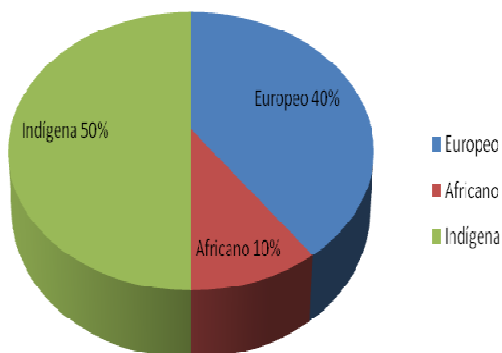


Figura 8. Distribución de la composición genética en la población venezolana. Se estima un 50% aporte indígena, 10% aporte africano y 40% aporte europeo (Arias, 2016).

Se estima que el $89\% \pm 2.4$ de los cromosomas paternos de nuestra población mestiza son de origen europeo, mientras que el ADN mitocondrial (origen materno) un $61\% \pm 1.9$ y un $20\% \pm 3.6$ son de origen amerindio y africano (Castro y col., 2011).

Estos valores permiten estimar que la frecuencia de los genes *AMELY* nulos en nuestra población puede ser parecida a la reportada en España 0,1% es decir 1/1000 individuos. Sin embargo, no tenemos reportes de la distribución de las frecuencias de *AMELY* nulo en las poblaciones provenientes del África centro-occidental, ni de nuestras poblaciones indígenas, lo cual no permite efectuar mejores comparaciones, es por ello la necesidad de realizar, en el futuro, este tipo de estudios enfocado en poblaciones venezolanas representativas, en particular en nuestras etnias indígenas. (Pollak y col., 1972).

El uso de las metodologías de Identificación Genética Forense han sido muy limitadas en nuestro país, por esta razón no se han realizado estudios donde se haya reportado la existencia de alelos *AMELY* nulos; es por ello la necesidad de iniciar el estudio de las características del gen *AMELY* en la población venezolana.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

✓ *Tipo de Investigación*

Se trata de una investigación de campo, de enfoque cuantitativo, descriptivo y experimental, es decir, consiste en la recolección de datos directamente de la realidad donde ocurren los hechos, sin manipular o controlar las variables (Palella y Martins, 2010). Estudia los fenómenos sociales en su ambiente natural, por lo tanto el investigador no manipula variables debido a que esto hace perder el ambiente de naturalidad en el cual se manifiesta.

En este sentido, Arias describe este tipo de investigaciones como la caracterización de un hecho, fenómeno, individuo o grupo, con el fin de establecer su estructura o comportamiento con el fin de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto (Arias, 2012).

✓ *Población y Muestra*

Para este estudio, se consideraron las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud, para trabajos de investigación en seres humanos (OMS, 2016). La población de este estudio estuvo conformada por 332 donantes de sangre masculinos no relacionados procedentes del Hospital General de los Valles del Tuy “Simón Bolívar” (n=145) y del “Hospital Universitario de

Caracas” (n=187). Se utilizaron 10 muestras de ADN de donantes femeninas como control interno del sistema.

Los voluntarios estuvieron informados sobre los objetivos y los alcances de este proyecto de investigación y a su vez firmaron una carta de consentimiento informado para el uso de su ADN genómico para este fin. Es importante resaltar que este proyecto fue sometido al escrutinio del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas.

✓ *Técnicas e Instrumentos para la Recolección de Datos*

En toda investigación es necesario el uso de técnicas de recolección de información para dar cumplimiento a los objetivos planteados. En tal sentido, Hernández (2010) define las técnicas de recolección de información “como aquellas que comprenden procedimientos y actividades que le permitan al investigador obtener información necesaria para dar respuesta a su pregunta de investigación”

Dentro de este orden de ideas, se utilizó como procedimiento de recolección de datos, una ficha que contiene los datos claves de los participantes en el estudio, el modelo de ficha empleado se presenta a continuación.



FICHA DE REGISTRO



Autorización e Identificación del Donante de la Muestra para el Proyecto:
Diagnóstico genético del sexo mediante el gen de la Amelogenina de aplicación forense, en una muestra de la población de Caracas, Venezuela.

Procedencia de la Muestra: Hosp. Clínico Universitario _____ Hosp. Valles del Tuy _____

Fecha: _____

Muestra: _____ Nombre y Apellido: _____

Edad: _____ Dirección: _____

Fecha de Extracción de ADN: _____ Resultado: _____

Observaciones: _____

Figura 9. Ficha de Registro para la recolección de datos. Los datos básicos del donante de la muestra quedan registrados en esta ficha.

✓ *Recolección de Muestras*

A cada voluntario se le extrajo 5 mL de sangre periférica por punción venosa y las mismas fueron colectadas en tubo con anticoagulante EDTA, tapa morada estándar, marca TUD®.

✓ *Extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre.*

Una vez colectadas las muestras, se dejaron en reposo unas horas o durante la noche en la nevera a 4°C, lo que permitió que se separaran por sus densidades los componentes de la sangre en dos grandes grupos; los glóbulos rojos, más densos, en la parte inferior del tubo y los glóbulos blancos,

menos densos que flotan sobre los primeros, esta capa de células blancas conocida en la literatura como el “*Buffy Coat*”, se extrajo con una pipeta Pasteur.

El ADN genómico se obtuvo del “*Buffy Coat*”, presentado en la siguiente figura; mediante el uso del protocolo de Bunce (Mulligan 1998, Welsh 1999) modificado y simplificado en nuestro laboratorio.

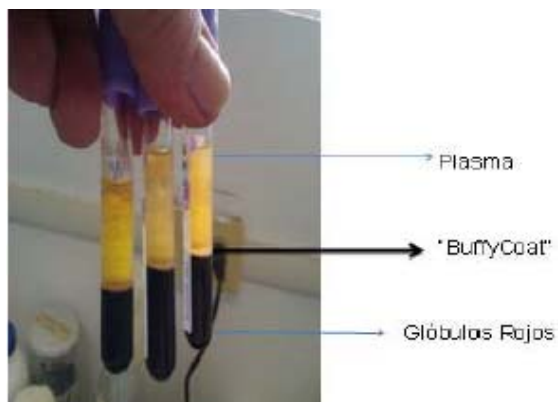


Figura 10. Extracción de ADN genómico. Nótese los componentes de la sangre separados por gradientes de densidad, de arriba hacia abajo: la primera capa formada por el plasma, una capa intermedia el “*Buffy coat*” y al fondo la capa de glóbulos rojos.

El “*Buffy Coat*” se trasvasó a un tubo cónico de 15mL y se le añadió 9mL de RCLB, mezclado por inversión varias veces; se dejó reposar por 5 min, luego se realizó un paso de centrifugación a 1.050g por 30 min, en centrifuga clínica, se descartó el sobrenadante y se lavó (centrifugación nuevamente) una vez más con 9mL de RCLB, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 600μL de NLB más SDS, este se transfirió a un vial eppendorf de 2 mL, posteriormente se incubó a 56°C por tres horas o hasta que se disuelva el sedimento, luego se añadió 100μL de NaCl 6M se mezcló vigorosamente con el vortex, se añadió 600 μL de cloroformo y se agitó con el vortex hasta que se formó una emulsión lechosa, luego se centrifugó a 15,6 g por 15 minutos en

una mini centrifuga, se transfirió la fase acuosa (superior) que contiene el ADN a un vial nuevo de 2mL, se añadió 1mL de etanol 100% bien frío, se agitó por inversión varias veces hasta que precipitó la red de ADN, presentada en la figura 11.



Figura 11. Precipitación del ADN. En la figura se observa la red de ADN que precipita una vez tratado con etanol al 100%.

Una vez obtenida la red de ADN, se centrifugó a 15,6 g por 15 min, se descartó el alcohol y resuspendió el precipitado en 1mL de etanol 70%, bien frío, luego se centrifugó a 15,6 g por 15 min, se descartó el alcohol, se dejó secar los tubos (abiertos en la campana) por 30 min, transcurrido el tiempo, se añadió 100µL de agua destilada inyectable y finalmente se incubó a 65°C por 15 min. En este punto el ADN estuvo listo para la PCR.

✓ **PCR para la determinación del sexo mediante uso del gen AMEL**

Una vez conocida la calidad del ADN extraído de cada una de las muestras, se procedió a realizar la PCR con los oligómeros S1 y S2 de Sullivan.

A continuación en la tabla 3, se describen los oligómeros o primers empleados para la identificación del sexo mediante el gen *AMEL*, señalando sus secuencias y el tamaño del producto de amplificación que generaron.

Tabla 3. Primers u oligómeros diseñados por Sullivan (Sullivan y col., 1993)

Primer	Secuencia	Banda esperada pb
S1	5'-CCCTGGGCTGTAAAGAATAGTG-3'	Cromosoma X 106pb
S2	5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'	Cromosoma Y 112 pb

Coctel de PCR

Siguiendo las indicaciones del fabricante de la polimerasa, la amplificación de los fragmentos se realizó en una mezcla de reacción de volumen final 13µL, que contiene 0,625 u/µL de Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega®), 0,17pmol/µL de los oligómeros S1 y S2, 0,4 mM de dNtP's (Promega®), Buffer 5X Green a una concentración final 1X, 1,25mM MgCl₂ (Promega®), H₂O cantidad suficiente para 8µL de volumen final. Se repartieron 8µL/vial de la mezcla y se agregaron 5µL de ADN, para un volumen final de 13µL.

Condiciones del termociclador para PCR

En la tabla 4, se especifican las condiciones del termociclador “TECHNE TC – 3000x”, que se utilizaron para la PCR del gen *AMEL*.

Tabla 4. Condiciones para la realización de la PCR

Condiciones	
Entrada 94°C x 1 min.	
Desnaturalización 94°C x 1 min.	
Alineamiento 60°C x 1 min.	35 ciclos
Extensión 72°C x 1 min.	
Salida 72°C x 10 min.	

✓ *Electroforesis para la visualización de los fragmentos de ADN, en geles de acrilamida.*

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), para evaluar el rendimiento del ADN extraído; preparados con buffer Tris-Ácido Acético (0.5X). (TAE: 40mM Tris-HCl, 20mM Acido Acético Glacial y 1mM EDTA a pH: 8.5). Se utilizó bromuro de etidio para la coloración (0,5µg/mL) y se empleo buffer de carga 1X [(0,25% p/v) azul de bromofenol, (30% p/v) glicerol y (0,25% p/v) de xilencianol].

La corrida de los geles se llevó a cabo en una cámara MiniRun, modelo EC360M (EC Apparatus), en buffer TAE 0,5X a 70-80 voltios (Welsh 1999). Los geles teñidos con bromuro de etidio se revelaron en un Trans-iluminador.

Una vez conocida la calidad del ADN extraído de cada una de las muestras, se procedió a realizar la PCR con los primers S1 y S2 de Sullivan. Los productos

finales de la PCR se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida no desnaturalizantes, teñidos con nitrato de plata.

✓ ***Análisis Estadístico***

El error típico es la raíz cuadrada de la varianza de la distribución muestral, de la frecuencia alélica, se calcula según la fórmula:

$$\text{Error} = \sqrt{p(1 - p)/n}$$

Donde p es la frecuencia del alelo mutado (calculada por conteo directo de genes) y n el número de individuos o el número de cromosomas Y.

✓ ***Prueba alternativa para la determinación del sexo mediante uso del gen AMEL***

Como prueba alternativa, en caso de encontrar alguna discrepancia en el diagnóstico del sexo, se realizará un ensayo utilizando las secuencias alfoides del cromosoma Y-DYZ3 (Waye, 1985; Witt, 1989).

A continuación, en la tabla 5 se describen los oligómeros que se emplearan como prueba alternativa para la identificación genética del sexo; señalando sus secuencias y el tamaño del producto de amplificación que generará.

Tabla 5. Primers u oligómeros diseñados por Waye (Waye y col., 1985)

Primer	Secuencia	Banda esperada pb
Y ₁ DYZ3	5'-ATGATAGAAACGGAAATATG-3'	Cromosoma Y 170 pb, marcador específico del cromosoma Y, es decir no amplifica en X.
Y ₂ DYZ3	5'-ATGAGAATGCAAAGGGCTCC-3'	

Es importante mencionar, que el procedimiento a seguir con estos primers alternativos será idéntico al que se empleó con los primers propuestos por Sullivan (coctel de PCR y corrida electroforética).

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se estudiaron 332 cromosomas Y: 145 masculinos, no relacionados, provenientes del Hospital General de los Valles del Tuy “Simón Bolívar” y 187 masculinos, no relacionados, provenientes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Caracas. Adicionalmente se utilizaron 10 muestras de ADN de donantes femeninas del Hospital de los Valles del Tuy, como control interno del sistema.

✓ *Cuantificación del ADN extraído*

En la figura 12, se muestra un lote del ADN extraído de 14 donantes. En general el protocolo de extracción utilizado rinde un ADN de buena calidad, apto para la PCR en la mayoría de los casos, con algunas excepciones, como el bolsillo 39 donde fallo la extracción.

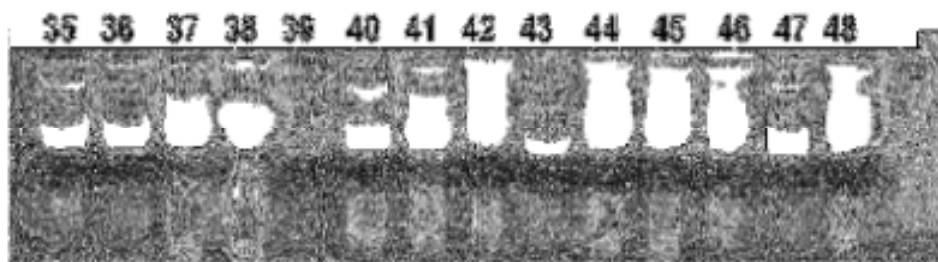


Figura 12. Corrida rápida en gel de agarosa al 1%, el ADN se visualiza con tinción de bromuro de etidio, iluminado con luz ultra violeta. Cada bolsillo representa el ADN extraído a partir de muestras de sangre de cada uno de los donantes.

✓ **Identificación del sexo por la PCR con los oligómeros S1 y S2, propuestos por Sullivan.**

A continuación se describen dos geles de acrilamida al 10%, donde se visualizan los productos de amplificación de muestras masculinas y femeninas, obtenidos por PCR con los oligómeros S1 y S2 de Sullivan; en la figura 13, se visualiza una banda de 112 pb la cual identifica al cromosoma Y y una banda de 106 pb que identifica al cromosoma X.

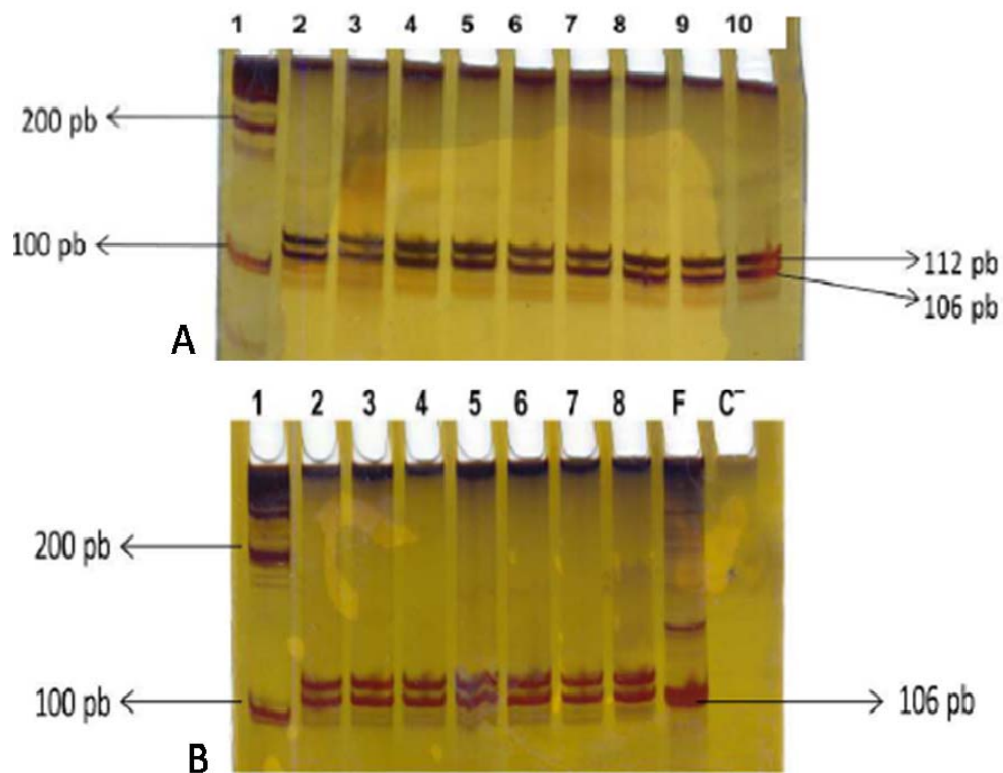


Figura 13. Geles de acrilamida 10% proporción 19:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. **(A)** Carril 1 marcador de peso molecular (Promega®), carriles del 2 al 10 muestras de donantes masculinos. **(B)** Carril 1 marcador de peso molecular (Promega®), carriles del 2 al 8 muestras de donantes masculinos, F donante femenino, C⁻ control negativo.

En la figura 13A se muestra la electroforesis de rutina, de los productos de amplificación de muestras masculinas, obtenidos por PCR con los oligómeros S1 y S2 de Sullivan, donde se logra observar claramente la doble banda que indica que las muestras son donantes masculinos. En contraste, en la figura 13B, en el carril F se encuentra el amplicón obtenido por PCR con los mismos oligómeros S1 y S2 de Sullivan, de un donante femenino, que se utilizó como control interno del sistema, observándose una única banda de 106 pb, la cual identifica al cromosoma X, lo que corresponde a un perfil clásico de un individuo femenino

Es de hacer notar, que este test o prueba se le realizó a las 332 muestras masculinas y a las 10 muestras femeninas control, buscando una discrepancia entre el sexo conocido del donante masculino y el perfil obtenido por la PCR con los oligómeros de Sullivan S1 y S2.

✓ ***Identificación de posibles AMELY nulos***

En la siguiente figura, presentada a continuación, se muestran la corridas electroforéticas de los amplicones obtenidos por la PCR con oligómeros S1 y S2, donde se observó una discrepancia entre el sexo del donante de la muestra y el sexo obtenido mediante técnicas de biología molecular. En la figura 14, en el carril 8 se puede observar un caso de posible *AMELY* nulo encontrado en este estudio.

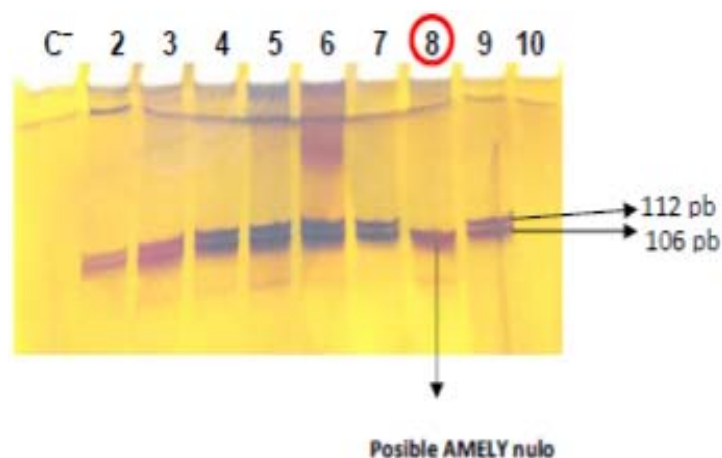


Figura 14. Gel de acrilamida 10% proporción 19:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carril C⁻ control negativo, carriles del 2 al 9 muestras de donantes masculinos. Nótese en el carril 8, una única banda correspondiente a 106pb.

La resolución en los geles de acrilamida, de la figura 14 se mejoro modificando la proporción acrilamida: bisacrilamida, así como también, la concentración final y el amperaje de la corrida para lograr una imagen más nítida con el fin de que se puedan apreciar mejor las bandas de los productos de amplificación. La formulación original proporción 19:1 y 10% de concentración final, se cambio por 29:1 y 15 % mejorando notablemente la separación entre bandas y la calidad fotográfica como se demuestra en las figura 15.

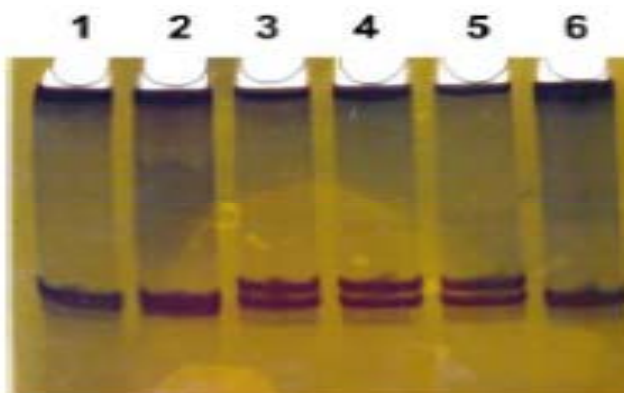


Figura 15. Gel de acrilamida 15% proporción 29:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carriles 1 y 2 muestras de donantes femeninos de sexo conocido, carriles 3, 4 y 5 muestras de donantes masculinos de sexo conocido, carril 6 posible AMELY nulo.

Tras la realización de la identificación de sexo en las 332 muestras de donantes masculinos, se encontró un caso de posible *AMELY* nulo, que con pruebas alternativas se pudo esclarecer el sexo verdadero del donante. La muestra problema estaba identificada como masculino en el rotulo del tubo de sangre proveniente del Hospital “Simón Bolívar” de los Valles del Tuy.

✓ ***Identificación de sexo por PCR con el marcador del cromosoma Y -DYZ3 propuestos por Waye y col.***

Tras la obtención del posible *AMELY* nulo, se procedió a realizar una prueba alternativa, para esclarecer el sexo de la muestra sospechosa, corroborar si se trata de un individuo de sexo masculino con una mutación en el gen de la amelogenina o se trata de un individuo femenino, a través del marcador Y-DYZ3, específico del cromosoma Y.

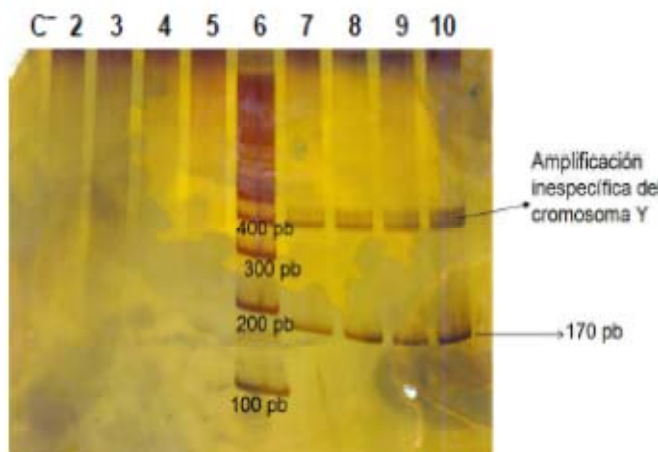


Figura 16. Estandarización de la prueba DYZ3. Gel acrilamida 12%, proporción 19:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carril C⁻ control negativo, Carriles 2 y 3 muestras de donante femeninos de sexo conocido, carril 4 y 5 muestra sospechosa de un *AMEL* nulo (por duplicado), carril 6 marcador de peso molecular (Promega ®), carriles 7 al 10 muestras de donantes masculinos de sexo conocido.

En la figura 16, se muestra la corrida de los amplicones obtenidos por PCR de dos muestras femeninas y cuatro muestras masculina y el caso de *AMEL* nulo, con los oligómeros diseñados para la secuencia del centrómero del cromosoma Y (DYZ3). Se evidencia a la izquierda del gel, la ausencia de amplificación en los carriles correspondientes a las muestras femeninas, y en la muestra sospechosa (carriles 2 al 5); a la derecha, se evidencia la presencia del cromosoma masculino Y en los cuatro carriles correspondientes a las muestras masculinas (carriles 7 al 10). Las bandas muestran el tamaño esperado de 170 pb.

La resolución del gel de la figura 16 se mejoro modificando la proporción acrilamida: bisacrilamida, 29:1, con una concentración final del 15 % mejorando notablemente la separación entre bandas y la calidad fotográfica como se demuestra en las figura 17.

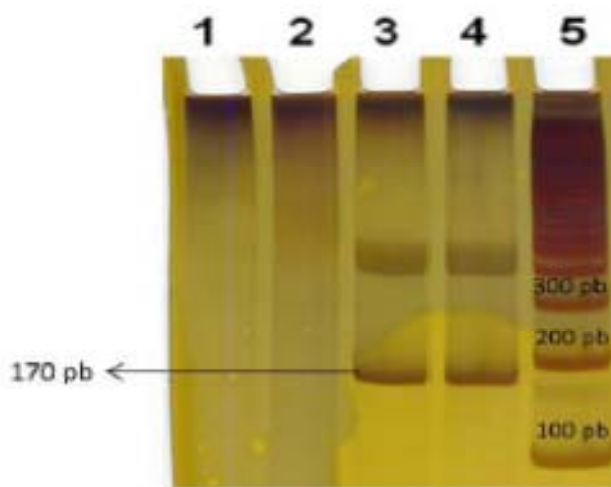


Figura 17. Gel acrilamida 15%, proporción 29:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carriles 1 muestra de donante femenino, sexo conocido, carril 2 muestra sospechosa de un posible *AMEL* nulo, carriles 3 y 4 muestras de donantes masculinos de sexo conocido, carril 5 marcador de peso molecular (Promega®).

Con la aplicación de la prueba alternativa propuesta para este caso sospechoso se logró dilucidar el sexo, por lo que se trataba de una muestra rotulada erróneamente, no podemos explicar cómo esto sucedió, ya que todas las muestras recibidas de los respectivos bancos de sangre venían rotuladas con nombre y apellido de cada individuo. Es de hacer notar que la muestra erróneamente rotulada provenía del Hospital Central de los Valles del Tuy, y el nombre Michelle en el rotulo de la ficha de registro es un nombre ambiguo, utilizado para nombrar a ambos sexos, es por esta razón a la que atribuimos la confusión de la muestra.

En este proyecto nos propusimos estudiar el gen *AMELY* en una muestra de la población masculina venezolana, donde se logró identificar el sexo de 332 individuos, en principio todos titulados como donantes masculinos, sin embargo, uno de ellos resultó ser muestra proveniente de donante femenino.

Con estos resultados se demostró la importancia del uso de pruebas alternativas, para aclarar discrepancias o dudas al momento de la identificación del sexo en casos de criminalística o de una simple identificación genética. Recomendamos a los laboratorios especializados, experimentar el uso de otros marcadores específicos del cromosoma Y, de forma de ampliar las posibles pruebas alternativas.

Es de hacer notar que estas pruebas alternativas no sustituyen la información que se puede obtener de un cariotipo, en aplicaciones clínicas como la identificación de alteraciones numéricas en los cromosomas sexuales como el síndrome de Klinefelter (47, XYY) y sus variantes (48, XXXY), y (49, XXXXY), síndrome de Turner (X0) y los rarísimos casos de hombres con cariotipo (46, XX) y mujeres con cariotipo (46, XY).

En este trabajo no se encontró ningún *AMELY* nulo, esto no indica la inexistencia de la mutación en población venezolana masculina, su frecuencia si existiera, debe ser menor que 0,003% (3 en 1000), por nuestra composición genética, es por ello que sería conveniente aumentar el N muestral, para corroborar lo antes expuesto, y realizar el muestreo en distintas zonas del territorio nacional, sobre todo en la población indígena del país.

En el caso de que se hallara un verdadero *AMELY* nulo, se recomienda secuenciar el fragmento, que se pudiera obtener por medio de la PCR con oligómeros alternativos como S1 y S2, de este modo se podría saber de qué tipo de mutación se trata. Es importante resaltar, que los oligómeros propuestos por Sullivan de uso universal en los kits de identificación genética forense, se puede afirmar hasta ahora, que resultaron 100% sensibles y específicos en la población venezolana.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Considerando los procedimientos de experimentación, análisis e interpretación de resultados en el presente trabajo de investigación, se presentan las siguientes conclusiones:

No se encontró ningún AMLEY nulo en los 332 donantes masculinos venezolanos, la frecuencia que podemos reportar hasta ahora es cero, por lo que se hizo innecesario calcular el error típico.

En este trabajo se ha demostrado que la aplicación de técnicas en biología molecular es de gran ayuda a la hora de existir discrepancia entre antropólogos y biólogos cuando se desee identificar el sexo de un individuo en casos penales.

Así mismo, se demostró que es indispensable el desarrollo y el uso de pruebas alternativas, para esclarecer discrepancias en los resultados de la determinación del sexo, en la identificación genética forense.

Concluimos, después de la búsqueda en la literatura nacional y comunicación personal con investigadores que se desempeñan en el área, que este es el primer trabajo realizado en nuestro país sobre la identificación del sexo por medio del uso de marcadores del gen AMEL, por lo que se recomienda reproducir estos experimentos en el interior del país, así como también en nuestras

comunidades indígenas venezolanas por considerarse las poblaciones más antiguas de nuestro territorio.

En este sentido, se considera necesario que el estado establezca un presupuesto anual para el estudio del gen de la amelogénina en la población venezolana, puesto que la labor del perito en Genética Forense consiste en presentar sus resultados de la forma más fiable y rigurosa posible ante un juez o tribunal.

Consideramos que el desarrollo científico ha permitido la introducción de la tecnología del ADN en la investigación forense, posibilitando el estudio de indicios biológicos mínimos, hecho que unos pocos años atrás era imposible. Sin duda, la introducción del estudio probabilístico de la prueba en las ciencias forenses, ha sido un enorme avance en la línea de aportar rigor a los estudios genéticos y reconocer su valía como prueba concluyente en una investigación criminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliográficas:

Akane, A., Seki, S., Shiono, H., Nakamura, H., Hasegawa, M., Kagawa, M. Matsubara K., Nakahori, Y., Nagafuchi, S. and Nakagome, Y. (1992). **Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene.** *Forensic Sci. Int.* **52**: 143-148.

Arias, F. S. (2016). **Comunicación Personal: Frecuencia génica y porcentaje de mezcla en diferentes aéreas geográficas de Venezuela.** Fundador del Primer Laboratorio de Genética Humana en Venezuela. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Arias Fidiás (2016). El proyecto de investigación: introducción a la investigación científica. 6ta Edición. Editorial Episteme. Caracas- Venezuela.

Asamblea General de la República Bolivariana de Venezuela (1999). **Constitución de la República Bolivariana de Venezuela.** Gaceta Oficial de la República, N° 36.860. [Extraordinaria], Marzo, 2000.

Asamblea General de la República Bolivariana de Venezuela (1998). **Ley Orgánica para la Protección del Niño, Niña y Adolescentes (LOPNA).** Publicada en la Gaceta Oficial N° 5. 266.

Butler, J.M. (2006). **Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing,** *J. Forensic Sci.* **51**(2):253-265.

Carracedo, A., Lareu, M.V., (1998). **Development of new STRs for forensic casework: criteria for selection, sequencing & population data and forensic validation, Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification.** Madison, Wisconsin: *Promega Corporation* 89-107.

Chang YM, Burgoyne LA, Both K. (2003). **Higher failures of amelogenin sex test in an Indian population group.** *J Forensic Sci.* **48**:1309-1313.

Chang Y.M., Perumal R., Keat P.Y., Yong R.Y.Y., Kuehn D.L. and Burgoyne L. (2007). **A distinct Y-STR haplotype for amelogenin negative males characterised by a large Yp11.2 (DYS458-MSY1-AMEL-Y) deletion.** *Forensic Sci Int*, **166**: 115-120.

Eastoe JE. (1965). **The chemical composition of bone and teeth.** *Adv Fluorine Res Dent Prevent* **3**: 5-17.

Fincham, A.G., Bessem, C.C., lau, E.C., Pavlova, Z., Shuler, C., Slavkin, H.C., Snead, M.L. (1991). **Human developing enamel proteins exhibit a sexlinked dimorphism.** *Calcif. Tissue Int.* **48**: 288-290.

- Fowler, J., Burgoyne, L.A., Scott, A., Harding, H.M. (1988). **Repetitive Deoxyribonucleic Acid (DNA) and human genome variation--a concise review relevant to forensic biology**, *J. Forensic Sci.* **33**:1111-1126.
- Francés, F., Castello, A., y Verdu F. (2008). **El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: métodos y posibles fuentes de error**. *Cuad Med Forense* **14**(52):119-125
- Gill, P., Brenner, C.M., Buckleton, J.S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. (2006). **DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures**, *Forensic Sci. Int.* **160**(2-3): 90–101.
- Gill, P., Brinkmann, B., d'Aloja, E., Andersen, J., Bär, W., Carracedo, C.(1997). **Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature**, *Forensic Sci. Int.* **87**(3):185-192.
- Gill, P., L. Fereday, N. Morling y P.M. Schneider. (2006). **The evolution of DNA databases-- recommendations for new European STR loci**. *Forensic Sci. Int.* **156**:242-244.
- Gill, P., Werrett, D.J. (1987). **Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting**, *Forensic Sci. Int.* **35** (2-3):145-148.
- Gill, P. (2002). **Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK—Past, Present, and Future perspectives**, *Biotechniques*. **32**:366-385.
- Hernández, Fernández y Baptista (2010). **Metodología de la Investigación**. México: Editorial Ultra S.A.
- International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC), **Finishing the euchromatic sequence of the human genome**, *Nature*. **431**:931-945.
- González, F., Andrade, D., Sánchez, G. Penacino, B. Martínez Jarreta, (2009). **Two fathers for the same child: A deficient paternity case of false inclusion with autosomic STRs**, *Forensic Sci. Int. Genet.* **3**:138–140.
- Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S.L. (1985). **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA**, *Nature*. **314**:67-73.
- Jeffreys, A., Brookfield, J.F., Semeonoff, R.. (1985). **Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints**, *Nature*. **317**:818-819.
- Lau, E.G., Mohandas, T.K., Shapiro, L.J., Slavkin, H.C. y Snead, M.I (1989). **Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes**. *Genomics* **4**:162-168.
- Lattanzi W(2005). **A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome**. *Hum Genet.* **116**:395-401.
- Mulligan C. G. et al. (1998), **A Rapid Method of Haplotyping HFE Mutations and Linkage Disequilibrium in a Caucasoid Population**. *Gut* **42**: 566-569.

Mulero, J.J., C.W. Chang, R.E. Lagacé, D.Y. Wang, J.L. Bas, T.P. McMahon y Hennessy, H.K. (2008). **Development and validation of the AmpFISTR MiniFile.** *J. Forensic Sci.* 53:838-852.

Nakahori, Y., Takenaka, O. y Nakagome, Y. (1991) **A human XY homologous region encodes “amelogenin”.** *Genomics.* 9: 264-269.

Palella S. y Martins F. (2010) **Metodología de la Investigación Cuantitativa.** 3era Edición. Ediciones EDUPEL. Caracas –Venezuela.

Roffey PE, Eckhoff CI, Kuhl JL. (2000). **A rare mutation in the amelogenin a gene and its potential investigative ramifications.** *J Forensic Sci.* 45:1016- 1019.

Sanz, J.M. (2002) **Identidad y primera persona.** *Rev Filosofía.* 25:21-40

Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. (1998). **Reliability of DNAbased sex tests.** *Nat Genet.* 18:103.

Smit,A.F., (1999). **Interspersed repeats and others mementos of transposable elements in mammalian genomes,** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:657- 663.

Sullivan, K.M., Mannucci, A., Kimpton, CP. and Gill, P. (1993). **A rapid and quantitative DNA sextest - fluorescence- based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin.** *Biotechniques* 15: 636-642.

Szibor, R. (2007). **X-chromosomal markers: past, present and future,** *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2):93- 99

Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. (2002) **Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis?** *Int J Legal Med.* 116: 121-123.

Urquhart, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J., Gill, P. (1994). **Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers,** *Int. J. Legal Med.* 107(1):13- 20.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.D., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G. (2001). **The sequence of the human genome,** *Science.* 291: 1304-1351.

Waye, J. y col., (1985). **Chromosome specific alpha satellite DNA nucleotide sequence of the 2.0 kilobase pair repeat from the human Y chromosome.** *Nucleic Acids Res* 13:2731-2743

Welsh K. I. and Bunce M. (1999), **Molecular Typing for the MHC with PCR- SSP.** *Reviews in Immunogenetics*1:157-176.

Witt, M., y col. (1989). **A rapid method for detection of Y chromosomal DNA from a dried blood specimens by PCR.** *Human Genetics*. **82**:271-274

Xueling Ou (2012). **Null alleles of the X and Y chromosomal amelogenin gene in a Chinese population.** *Int J Legal Med* **126**:513–518.

Electrónicas:

Combined DNA Index System (CODIS). <https://www.fbi.gov/>. Consulta, noviembre de 2016

Marcadores genéticos del CODIS <http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis>. Consulta, septiembre de 2016.

Mundarayn, Z. (2015). **Trabajo investigativo y criminalístico del Ministerio Público.** *Ministerio Público*. Caracas- Venezuela. <http://www.mp.gob.ve>. Consulta, agosto de 2015.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Consentimiento informado para investigaciones en seres humanos. <http://www.who.int/es/> Consulta, 22 de octubre de 2016.

ANEXOS



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIO DE PATOLOGÍA MOLECULAR
CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
ESCUELA "LUÍS RAZETTI"**

EXPLICACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL PROYECTO PARA EL DONANTE:

**ESTUDIO DEL GEN AMELY EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN VENEZOLANA:
IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES MUTACIONES Y SUS FRECUENCIAS**

Los cromosomas X y Y determinan el sexo en los humanos. Así, al nacer, el portador de dos cromosomas X (X,X) será una hembra y el portador de un cromosoma X y uno Y (X,Y) será varón. Por esta razón se los conoce como "Cromosomas Sexuales".

Existe un gen, el gen de la Amelogenina, que tiene dos copias, una está situada en el cromosoma X y se la conoce como AMELX y la otra está situada en el cromosoma Y y se la conoce como AMELY. Se descubrió que existe una pequeña diferencia de tamaño entre ambas copias, la copia que está en el cromosoma Y es ligeramente más grande que la copia que está en el X. Esta pequeña diferencia de tamaño se puede detectar y se la utiliza para determinar el sexo del donante, en el caso de que, por alguna razón, no se conociera. Esto se conoce como "Identificación Genética".

En nuestro país se está empezando a utilizar este gen, y otros, con fines de identificación genética

En este proyecto queremos mejorar el conocimiento de las características genéticas de nuestra población y el uso de este tipo de marcador y otros para la identificación, el diagnóstico y la prevención de enfermedades.

Para este fin le pedimos al Voluntario una pequeña muestra de sangre que facilitará nuestros estudios y será una gran contribución para el avance de la ciencia en nuestro país.

Anexo 1. Hoja de explicación a los donantes de muestras. Oficio entregado a los participantes del estudio, antes de firmar el consentimiento informado.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO DEL GEN AMELY EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN VENEZOLANA: IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES MUTACIONES Y SUS FRECUENCIAS

Yo, Edison Duran, portador de la C.I.V. A 400 827, siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento, naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con este estudio de investigación, declaro mediante la presente:

1. Que se me proporcione una carta explicativa de los alcances del proyecto sobre el Estudio del gen AMELY y su importancia para el avance de los conocimientos del Acervo Genético de la Población Venezolana en beneficio de la población en general y las mejoras en el uso de marcadores genéticos para la identificación individual.
2. Leí la carta, entendí el planteamiento, entiendo que mi muestra de ADN será utilizada solo dentro del proyecto y para ningún otro fin y acepto donar una muestra de sangre para ello.
3. Que bajo ningún concepto podre restringir el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos en el presente estudio y que autorizo a la difusión parcial o total de los resultados obtenidos en el mismo.
4. Que mi participación en dicho estudios, no implica riesgo, ni inconveniente alguno para mi salud.
5. Que cualquier pregunta que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida oportunamente por parte del equipo de investigadores.
6. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico, producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Que los resultados de las pruebas realizadas me serán entregados oportunamente.

Yo, Edison Duran, de la comunidad Dumme cel ty, estoy de acuerdo con mi participación en este proyecto, y permito la donación de mi muestra de sangre, para su análisis por parte de los responsables de la ejecución de este proyecto.

<u>Edison Duran</u>	<u>[Firma]</u>	<u>16-02-2016</u>
Nombres y Apellidos	Firma	Fecha
<u>Ronell Ruvo</u>	<u>[Firma]</u>	<u>16-02-2016</u>
Nombre del Investigador	Firma	Fecha

Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas, Baruta, Caracas 1080. Apartado Postal 17606, Caracas, Venezuela
Teléfonos: +58212-903.50.00/903.50.02- Fax: +58 212- 903.50.03
www.idea.gob.ve

Anexo 2. Consentimiento informado. Documento que firman los voluntarios, que aceptan ser parte del estudio.