

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 El DNA y su estudio en los individuos

1.1.1 El DNA base de la herencia

El cuerpo humano está compuesto por billones de células, poseyendo cada una de ellas (excepto los gametos) 46 cromosomas, 23 de ellos heredados por la madre y 23 por el padre. Cada cromosoma es esencialmente una molécula de DNA, asociado a proteínas, que contiene numerosos genes que almacenan y transmiten toda la información genética requerida para el desarrollo de un individuo.

El DNA es una macromolécula de doble hélice cuya estructura fue descubierta por Watson y Crick en 1953 (1). Es un polímero formado por dos cadenas complementarias de desoxinucleótidos, capaces a su vez de replicarse para producir copias complementarias de sí mismas, asegurando de esta manera que el material genético sea heredado íntegro y fielmente, de generación en generación.

Los eslabones del DNA los forman cuatro nucleótidos que difieren en sus bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina). La información genética consiste en el orden preciso de los cuatro diferentes nucleótidos a lo largo de la cadena de DNA.

Los genetistas moleculares modernos tienen el gran desafío de determinar la secuencia nucleotídica de los tres mil millones de nucleótidos que constituyen el genoma humano, para comprender los mecanismos genéticos, de control del desarrollo y entender los factores que desencadenan las enfermedades. Esta tarea es sin duda un gran reto, pero también una gran oportunidad para impulsar aún más a la Genética.

1.1.2 Genética de poblaciones

Una de las ramas de la Genética Humana, la Genética de Poblaciones, estudia la distribución de los genes en las poblaciones y cómo se mantienen ó cambian sus frecuencias alélicas y genotípicas.

1.1.3 Genes en poblaciones humanas

La especie humana, de cerca de 5 mil millones de individuos, se divide en Caucásicos, Negros y Asiáticos. Estos tres grandes grupos con características genéticas claramente distinguibles se denominan razas y cada una esta formada por numerosos subgrupos poblacionales, con ligeras diferencias genéticas entre sí, denominados grupos étnicos.

La diversidad genética entre razas y subpoblaciones tiene su origen en las mutaciones. El establecimiento de las diferencias genéticas entre las poblaciones se produce como resultado de la selección de mutaciones, en respuesta a condiciones

ambientales regionales, a la perpetuación de mutaciones neutrales específicas y aún de mutaciones nocivas, además del grado de reproducción aislada entre los grupos.

Existen diferencias muy marcadas entre grupos poblacionales en las frecuencias alélicas, tanto para genes causantes de enfermedades como para marcadores genéticos neutrales selectivos, como lo son ciertos grupos sanguíneos, algunos polimorfismos proteicos y de DNA. Los primeros son muy significantes para la determinación de riesgos de recurrencia de enfermedades genéticas en poblaciones específicas y los últimos son importantes como marcadores de la evolución humana reciente (2).

1.1.4 Diversidad genética entre individuos

Cada individuo es genéticamente único. Esta individualidad radica en las variaciones que se presentan dentro de su secuencia nucleotídica de manera silenciosa; es decir, sin provocar enfermedad. Sin embargo, cada individuo mantiene las características genéticas de la raza y subpoblación (grupo étnico) al cuál pertenece.

Las mutaciones nocivas que producen cambios fenotípicos son fácilmente detectables. Pero, un gran número de mutaciones son selectivamente neutras, no causan daño y no se manifiestan fenotípicamente. En estas últimas, la variación se localiza en regiones extragénicas ó no codificantes, ó en regiones heterocromáticas de los cromosomas.

En el transcurso de la evolución, el flujo constante de nuevas variaciones nucleotídicas ha asegurado un alto grado de diversidad e individualidad genética. Esta puede manifestarse como cambios en el patrón de tinción de los cromosomas

(heteromorfismos cromosomales), variaciones protéicas (Ej. grupos sanguíneos), ó cambios nucleotídicos en diversas regiones del genoma (2).

1.1.4.1 Identificación de individuos

La identificación de individuos se ha realizado tipificando diferentes marcadores genéticos como los antígenos de los grupos sanguíneos, los del complejo mayor de histocompatibilidad, isoenzimas y proteínas séricas.

Estos marcadores carecen de un alto grado de discriminación e identificación por la baja frecuencia alélica que presentan y por el número limitado de marcadores. Pueden resolver casos de exclusión, pero frecuentemente carecen de un alto grado de identificación positiva, por lo que se requieren pruebas múltiples (3).

Un gran número de proteínas diversas son utilizadas como marcadores genéticos, cuya utilidad depende de la variabilidad heredable del DNA que las codifica. Actualmente, la tipificación del DNA se utiliza como una herramienta poderosa para la identificación de individuos con un mayor poder predictivo que el de las pruebas serológicas.

1.2 Polimorfismos Genéticos

Gran cantidad de genes se caracterizan por tener un número relativamente común de alelos, que permiten clasificar a los miembros de una población originada naturalmente dentro de fenotipos finamente distinguibles.

Un polimorfismo genético se define cuando un gen tiene múltiples alelos y donde al menos dos de ellos tienen frecuencias mayores al 1% entre la población y cuando la frecuencia de heterocigotos en la población es de al menos 2%. No obstante, debido a que muchos loci polimórficos se caracterizan por tener un alto número de alelos diferentes, la proporción de heterocigotos es mucho mayor. A los alelos con frecuencias menores de 1% se le llaman variantes raras (2).

1.2.1 Usos de los polimorfismos en Genética

Los polimorfismos se utilizan como marcadores genéticos que permiten distinguir el patrón de herencia de un gen en estudios familiares.

Tienen aplicación práctica en:

- a. Localización y mapeo de genes en cromosomas individuales mediante estudios de análisis de ligamiento.
- b. El diagnóstico presintomático y prenatal, así como en la detección de portadores (heterocigotos) de enfermedades genéticas.
- c. La evaluación del riesgo en personas con predisposición a desórdenes como enfermedades coronarias, cáncer y diabetes, entre otras.
- d. Estudios de paternidad, forenses y casos de inmigración.
- e. Establecer la compatibilidad donador-receptor para realizar transplantes de tejidos y órganos.
- f. La identificación de gemelos idénticos.

1.2.2 Polimorfismos a nivel del DNA

Los recientes avances en genética molecular han permitido explorar la variabilidad directamente en el DNA, logrando así el desarrollo de poderosos sistemas de tipificación que han revolucionado no sólo a la medicina, sino también a otros campos de la Biología (4). Los polimorfismos en la estructura del DNA son la base de los análisis genéticos. Las primeras variantes de secuencia en el DNA humano que fueron analizadas directamente fueron cambios de una base que destruían o creaban sitios de reconocimiento para una enzima de restricción. Se les refiere como polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (Figura 1). En este tipo de polimorfismos solo hay dos posibilidades alélicas, su informatividad es limitada a un máximo de heterocigosidad del 50% (5).

1.2.2.3 Regiones Hipervariables

El descubrimiento de Wyman y White en 1980 de un segmento de DNA humano al cuál definieron como locus multialélico fue la primera demostración directa de la existencia de regiones hipervariables (HVRs) en el DNA humano (6).

Más recientemente, un número mayor de loci multialélicos han sido descritos(7, 8, 9). En cada caso, la región hipervariable consiste de repeticiones en tandem de secuencias cortas. La hipervariabilidad en estos minisatélites deriva del cambio en el número de repeticiones, presumiblemente inducida por recombinación desigual entre minisatélites mal alineados o por deslizamiento de la horquilla principal de replicación, originando ganancia o pérdida de unidades repetidas. Como resultado de ésto, se genera una variabilidad alta de alelos de diferentes longitudes y una frecuencia de heterocigotos para éstos en algunos casos de hasta el 100% (10).

El genoma humano contiene cientos de segmentos altamente polimórficos (aproximadamente un 25%), caracterizados por la repetición en tandem en número variable de ciertas secuencias. Estas, están esparcidas en el genoma humano, así como en otros genomas eucarióticos, desplegando una amplia variabilidad en el número de unidades que se repiten, encontrándose unidades desde 5 000 000 hasta repeticiones de dinucleótidos o incluso mononucleótidos (11). Estos segmentos se denominan colectivamente "Regiones Hipervariables" (HVR) o "VNTRs", y se subclasifican en micro- y minisatélites, dependiendo del tamaño y la estructura de la secuencia que se repite (Figura 1). Los marcadores VNTR son altamente informativos y útiles para realizar análisis de ligamiento genético, diagnóstico clínico e identificación de individuos.

1.2.2.4 Microsatélites o STRs

Las regiones hipervariables en donde la secuencia principal (core) que se repite en tandem tiene un tamaño de 2 a 5 pb, se denominan microsatélites o polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (de sus siglas en inglés STRs).

El carácter polimórfico de los loci STRs es el resultado de la variabilidad en el número de repeticiones en tandem de un alelo a otro. Diferentes tipos de loci STRs han sido descritos incluyendo di-, tri- y tetranucleótidos (12, 13, 14).

Hoy en día, el análisis de los STRs mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas del inglés) es un método ampliamente utilizado para realizar la identificación de individuos (15, 16, 17, 18) . Además se pueden amplificar varios loci STRs mediante PCR multiplex y detectar los fragmentos con tinción con plata o en forma automatizada utilizando diferentes compuestos fluorescentes (19).

1.2.2.5 Minisatélites o VNTR's

El DNA minisatélite consiste de repeticiones cabeza-con-cola (tandem) de una secuencia pequeña repetida en tandem (8-90 pb). La variación alélica de estos loci se deriva del número de repeticiones, y por consiguiente del tamaño de la región.

El número de alelos posibles es en principio ilimitado. Se pueden encontrar un gran número de alelos diferentes para un loci específico, siendo algunos incluso raros o de frecuencia baja en una población determinada. Un locus será mucho más informativo mientras más variable sea; es decir, con un gran número de alelos diferentes y cada uno con baja frecuencia. Gran número de minisatélites son utilizados en una amplia variedad de análisis genéticos debido a su alto nivel de informatividad y a sus numerosas ventajas (20).

1.2.2.6 Análisis multi-locus

La detección simultánea de una gran cantidad de loci hipervariables se ha convertido en una poderosa herramienta en el análisis genético. La alta resolución lograda por la combinación de un gran número de regiones altamente variables o polimórficos hace posible identificar un perfil individual específico, al que se ha llamado huella digital de DNA o huella genética (DNA fingerprinting en inglés). Los estudios de huella genética tienen aplicación principalmente en establecer relaciones de parentesco familiar y en identificación forense. Además de ser utilizados en humanos, también tienen importantes aplicaciones en otras áreas (21).

1.2.2.7 Perfiles unilocus

Los loci minisatélites hipervariables estudiados en forma independiente, se utilizan como marcadores genéticos altamente informativos. Algunas de las aplicaciones de los minisatélites unilocus son:

En estudios de ligamiento de enfermedades genéticas, que se pueden realizar más eficientemente usando marcadores tipo minisatélite que son extremadamente informativos.

Permiten distinguir con eficiencia los dos alelos de un individuo de un locus específico, siendo de particular importancia para detectar la pérdida de alelos en tumores (22) y detectar cariotipos anormales como en las disomías uniparentales (23).

En la determinación de la identidad en individuos a partir de especímenes forenses, el estudio de un locus requiere una cantidad muy pequeña de DNA (50 ng de DNA genómico humano), en comparación con el análisis del DNA con pruebas tipo multilocus, donde la cantidad de DNA debe de ser mayor; además de que se puede realizar el estudio en mezclas de DNA en casos forenses (24).

Las pruebas son más sencillas que las que utilizan pruebas multilocus. Los perfiles que se obtienen son de fácil interpretación y pueden introducirse en bases de datos para estimar el tamaño de los alelos. Las pruebas son específicas para DNA humano y no se presenta hibridación cruzada con DNAs de otras especies, a diferencia de las pruebas multilocus (20).

1.2.2.8 Tipificación de VNTRs por PCR

La técnica de Southern blot se utilizaba inicialmente para realizar la genotipificación de marcadores tipo VNTRs. Este ensayo requería de mucho tiempo, radiactividad y grandes cantidades de DNA (microgramos). Las regiones HVRs se pueden analizar mediante técnicas de hibridación tipo Southern blot con sondas unilocus o multilocus marcadas con radiactividad, fluorescencia o con sustancias químicas cromogénicas.

La PCR vino a aumentar en mucho la sensibilidad de la tipificación de VNTRs, ya que puede realizarse a partir de ng de DNA (25). Además, ha venido a aportar numerosas ventajas como el no utilizar radiactividad, su mayor rapidez, menor consumo de reactivos y materiales, etc.

Con iniciadores colocados de manera específica fuera de las unidades de repetición y que son regiones no repetidas, se obtienen fragmentos amplificados por PCR, de longitud correspondiente al número de repeticiones. Esta técnica representa un método conveniente para analizar loci VNTRs y se le conoce como AmpFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados.

Utilizando la técnica Amp-FLP se pueden amplificar VNTRs con tamaño de hasta 2 kb y los fragmentos pueden resolverse mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución (PAGE). Los fragmentos pueden visualizarse con técnicas de tinción con bromuro de etidio, plata, hibridando con sondas marcadas con fluorescencia o con cromógenos. En la figura 1 se ilustra la manera en que funcionan los tres tipos de polimorfismos mencionados y a continuación se describen los que se seleccionaron para el presente trabajo de tesis.

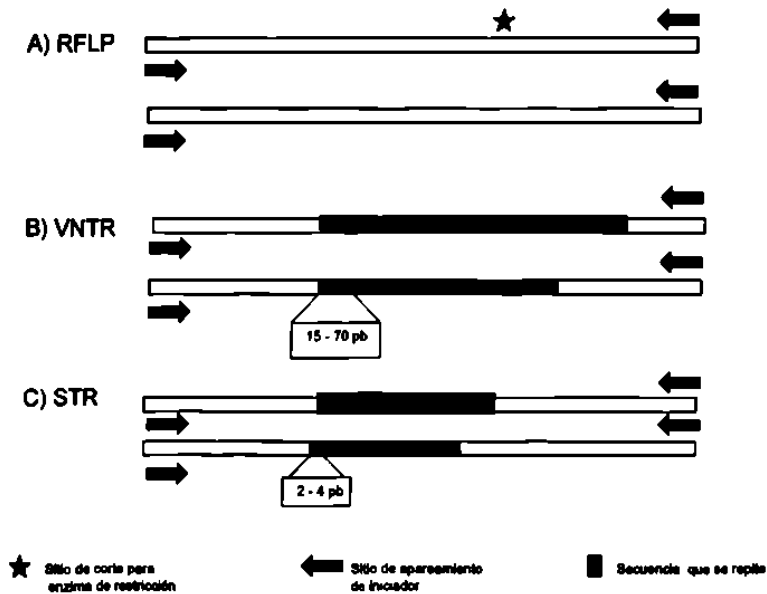


Figura 1. Amplificación de polimorfismos de DNA por PCR. Esquema de los polimorfismos que pueden ser amplificados por PCR: a) RFLP's, b) VNTR's y c) STR's. Los iniciadores en todos los casos tienen que flanquear las regiones polimórficas.

1.3 El marcador genético Apo B

1.3.1 El gen ApoB

El gen que codifica para la Apolipoproteína B (ApoB) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p24-p23) (26). El gen mide 43 kb y contiene 28 intrones. Su RNAm tiene una longitud de 14,121 nucleótidos y codifica para una proteína monomérica de 4,563 aminoácidos con un péptido señal de 27 aa (27). El gen ApoB en realidad codifica para dos proteínas: ApoB-100, de 513,000 daltons, que se sintetiza en el hígado, y ApoB-48 de 250,000 daltons, sintetizada en el intestino. Esto como resultado de la acción de la enzima citosin desaminasa que se une al RNAm de

Apo B en el codon 2,153 (CAA= Gln) y convierte la C en U, introduciendo un codón de terminación prematuro (UAA=Terminación). La ApoB-48 producida en el intestino a partir del RNAm modificado corresponde a la mitad del extremo amino terminal de la Apo B-100 (28).

1.3.2 Minisatélite 3' en el gen Apo B

Estudios realizados utilizando el DNAc de Apo B y sondas genómicas, hicieron posible la identificación de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP's) en el extremo 3' del gen Apo B (29). La digestión enzimática de diferentes DNAs humanos en sitios flanqueantes a esta región y utilizando análisis tipo Southern blot, revelaron regiones que variaban en aproximadamente 300 pb de longitud con cinco alelos distinguibles. Este polimorfismo se origina por un minisatélite rico en AT que consiste de repeticiones en tandem de dos subunidades centrales "core" de 15 pb y de secuencias estructuralmente relacionadas, denominadas *x* (*ATAATTAAATATTTT*) y *y* (*ATAATTAAATATTTT*). Estas dos secuencias están muy relacionadas, difieren solamente en las posiciones 10-12 donde la secuencia *x* tiene TAT y la *y* tiene ATA. (30). Este locus hipervariable se localiza a menos de 100 pb hacia el extremo 3' de la segunda señal de terminación de la transcripción del gen Apo B (26).

1.4 El marcador genético D1S80

1.4.1 El minisatélite D1S80

El locus hipervariable D1S80 fue inicialmente identificado por la sonda pMCT118. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 y tiene una segregación autosómica codominante (31).

El locus D1S80 contiene secuencias de DNA repetidas en tandem (VNTR) (32). La unidad que se repite tiene un tamaño de 16 pb de longitud y los alelos tienen tamaños variables desde 350 a 1000 pb. Más de 22 alelos diferentes han sido identificados y con repetición de unidades desde 14 hasta 50 veces (33).

1.4.2 Análisis de D1S80 por Amp-FLPs

El locus D1S80 fue clonado y secuenciado, lo que permitió identificar secuencias conservadas flanqueantes a la región hipervariable que sirvieron para diseñar iniciadores y utilizarlos para su amplificación y tipificación por PCR (34).

Además, la secuencia nucleotídica obtenida confirmó que el tamaño de la unidad que se repite es de 16 pb y reveló que contiene una secuencia “core” GNNGTGGG, característica de los VNTRs ricos en G.

Dado que los alelos varían en el número de repeticiones, el tamaño de los fragmentos amplificados es variable. Estos pueden ser resueltos y tipificados mediante el

análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida, de alta resolución, discontinuos y teñidos con bromuro de etidio o con plata (34, 35, 36).

1.4.3 Utilidad de D1S80

D1S80 es un minisatélite altamente polimórfico que tiene su aplicación principal en estudios de identificación de individuos.

El locus D1S80 es uno de los marcadores Amp-FLP más utilizados en el campo forense (33, 34, 37) es específico del DNA humano y se hereda en forma mendeliana (38).

El Departamento de Genética Humana de la compañía Roche Molecular Systems, Inc. (Alameda, CA) ha desarrollado un estuche de tipificación para D1S80 (*AmpliFLP D1S80 PCR Amplification Kit*). La validación realizada a este estuche demostró que la tipificación se puede hacer a partir de muestras biológicas como manchas de sangre, semen y saliva (38).

Se han obtenido resultados confiables en el análisis de D1S80, a partir de restos humanos en descomposición, demostrando así que muestras que no son adecuadas para el análisis por RFLPs pueden ser analizadas utilizando marcadores Amp-FLPs (39)

1.5 El marcador genético HLADQA1

1.5.1 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) esta compuesto por un gran grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6. En base a sus diferencias estructurales y funcionales, se dividen en las Clases I, II y III. Cada una de éstas es altamente compleja y polimórfica (Figura 2).

Las clases I y II corresponden a los genes de los antígenos de los leucocitos humanos (HLA), descubiertos originalmente en virtud a su importancia en el transplante de tejidos entre individuos no relacionados.

Los genes de la clase III del MHC incluyen genes para proteínas como el factor properdina B, C2 y C4, que son parte del sistema de complemento, una serie de proteínas séricas polimórficas y de receptores membranales involucrados cercanamente en la función inmune. Estos genes no se consideran dentro de los genes HLA por ser funcionalmente diferentes a la clase I y II (2).

Los genes de la Clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) codifican para antígenos integrales de las membranas plasmáticas de células nucleadas. Estos antígenos no solamente estan involucrados en el rechazo de transplantes, sino que también tienen un papel crítico en la inmunocompetencia, en el reconocimiento e interacción de linfocitos y en el desarrollo de autotolerancia. Un antígeno de Clase I consiste de dos subunidades polipeptídicas, una cadena pesada codificada por el MHC y un polipéptido no polimórfico, β_2 microglobulina, codificado por un gen del cromosoma 15 (2).

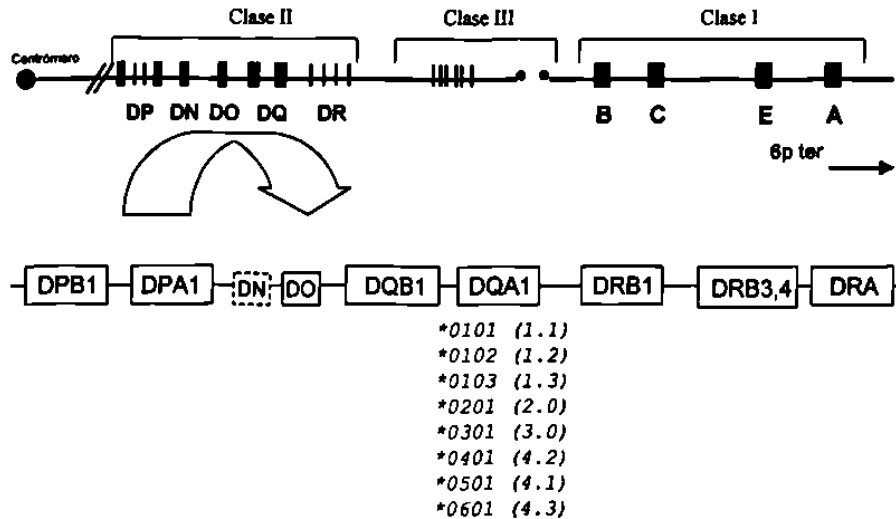


Figura 2 Esquema de la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Se representan las clases I, II y III, así como los genes que la forman. También se mencionan los 8 diferentes alelos descritos para DQA1 (entre paréntesis se indica la nomenclatura utilizada en este trabajo).

Los genes de la Clase II HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR codifican antígenos que se expresan en los linfocitos B, macrófagos, monocitos, células endoteliales y linfocitos T activados. Cada molécula de clase II es un heterodímero formado por dos glicoproteínas transmembranales estrechamente unidas, una subunidad α y una β , ambas codificadas por el MHC.

Los antígenos HLA clase I y II participan de manera muy importante en el inicio de la respuesta inmune, ya que se encargan de presentar el antígeno a los linfocitos T al formar el complejo antígeno-molécula HLA (40).

Se han descrito otros genes de la clase I y II, algunos son pseudogenes. La identificación de epítopes de clase I y II puede realizarse a nivel celular, de proteínas y del DNA.

Los genes de los loci MHC son altamente polimórficos, es decir que en una población determinada existen diferentes alelos para cada locus. Cada individuo perteneciente a una población hereda dos alelos específicos en cada locus, característica que lo distingue genéticamente de otro individuo.

1.5.2 El estudio genético de HLA

El Sistema Mayor de Histocompatibilidad (HLA en humanos) es uno de los sistemas polimórficos mejor estudiados para establecer diferencias entre poblaciones y asociación con enfermedades (40).

Los genotipos en los loci HLA clase I y II inicialmente se identificaban con anticuerpos policlonales selectivos que discriminaban variantes antigénicas. Con el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, fue posible estudiar ampliamente los genes y sus polimorfismos, en esta región del cromosoma 6.

Los antígenos HLA controlan la regulación de la respuesta inmune. La selección natural pudiera explicar el patrón de la variación global de las frecuencias alélicas en este complejo génico. Gracias a la alta variabilidad que presentan los loci HLA, son utilizados ampliamente en estudios de parentesco y para estudiar la migración y el origen de las poblaciones humanas (41).

1.5.3 Análisis molecular de los genes de clase II (HLAD)

Procedimientos serológicos, así como ensayos celulares y moleculares, se han utilizado para realizar la tipificación de la región HLA-D (42).

La tipificación mediante DNA ha permitido establecer la organización molecular de la clase II, definir alelos y establecer susceptibilidad a enfermedades (43, 44, 45, 46). Diferentes metodologías como los RFLPs han sido utilizados para definir nuevos alelos DR, DQ y DP. Se han utilizado ensayos de hibridación con sondas marcadas con ^{32}P y más recientemente con biotina, PCR seguida de la digestión con enzimas de restricción, así como la amplificación con iniciadores de secuencia específica (SSPA) (44, 46, 47, 48).

1.5.3.1 Hibridación alelo específica de HLADQA1

El uso de la PCR y sondas oligo-alelo-específicas (de sus siglas en inglés SSOP) ha facilitado el estudio de los polimorfismos HLA en genes específicos de este complejo génico (46, 49). El más estudiado por PCR-SSOP es el locus HLADQA1 (DQ α) (41). Este gen es de la clase II y contribuye en la respuesta inmune codificando la cadena α del heterodímero de superficie en las células presentadoras de antígenos. El polimorfismo de DQA1 se localiza en el segundo exón del gen y al menos 8 alelos pueden ser detectados mediante PCR-SSOP (DQA1*0101,-*0102, -*0103, -*0201, -*0301, -*0401, -*0501, y -*0601). La compañía Perkin Elmer también desarrollo un estuche para la tipificación de DQA1, el cuál ha sido utilizado ampliamente para caracterizar diferentes poblaciones, y es capaz de identificar 6 alelos (los alelos -*0401, -*0501 y -*0601 se tipifican por una sola sonda). La combinación de estos 6 alelos origina 21 genotipos diferentes (48, 50).

1.6 Justificación

Es muy importante la caracterización de poblaciones para que los genetistas interesados en llevar a cabo la identificación de individuos, utilizando marcadores genéticos, tengan una base de datos que fundamente estudios estadísticos y así la información derivada de los laboratorios de genotipificación pueda ser interpretada en forma adecuada. Existe una gran cantidad de marcadores genéticos, desde secuencias codificantes muy polimórficas como las comprendidas en el sistema HLA, hasta secuencias altamente polimórficas de secuencias repetidas en tandem como los STRs y VNTRs. Para escoger el sistema mas adecuado para la población mexicana, es necesario estudiar cada uno de ellos y obtener los datos de frecuencias alélicas y genotípicas. Debido a lo anterior, se plantearon para el presente trabajo, los siguientes objetivos.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Determinar las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos D1S80, Apo B y HLADQA1 en una muestra de individuos del Noreste de México.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Optimizar condiciones de amplificación y detección de las variantes alélicas para los marcadores genéticos D1S80, ApoB y HLADQA1.
2. Determinar los alelos presentes en la población del Noreste de México para cada marcador.
3. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los marcadores genéticos analizados.
4. Comparar la información obtenida con reportes descritos previamente en diferentes poblaciones.
5. Determinar la utilidad de estos marcadores genéticos en la identificación de individuos y pruebas de paternidad.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Area de trabajo, reactivos y equipo

2.1.1 Area de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

2.1.2 Material biológico

De cada uno de los individuos a analizar se obtuvieron muestras de sangre periférica tratada con EDTA (50 mM, concentración final), como anticoagulante.

2.1.3 Reactivos químicos

Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, trizma base, tritón X-100 y fenol, adquiridos en Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, EUA), así como ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico y etanol, de Merck de México.

La amplificación de D1S80 y Apo B se realizó con iniciadores sintetizados en la ULIEG por el método de fosforamiditas en un sintetizador de oligonucleótidos

Beckman 1000 (Fullerton, CA, EUA). Se utilizaron también enzima Taq DNA polimerasa de Perkin Elmer (Branchbury, NY, EUA), buffer de reacción, cloruro de magnesio y dNTP's de Promega (Madison, WI, EUA) y aceite de Sigma Chemical Company.

Para la electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilene cianol y bromuro de etidio de Sigma Chemical Company. Para la electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida-bisacrilamida, TEMED, EDTA, trizma base, glicerol, bromuro de etidio, ácido sulfúrico. Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis, se utilizaron los DNAs plasmídicos pBR322 y pUC18, digeridos con la enzima de restricción *Alu* I, el DNA del bacteriófago lambda de Gibco-BRL digerido con *Pst* I. También, para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizaron un marcador tipo escalera de 100 pb de Pharmacia (Alameda, CA, EUA) y un marcador alélico de D1S80 de Perkin Elmer. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs (Beverly, Ma, EUA), y los DNAs plasmídicos se obtuvieron mediante técnicas de mediana escala realizadas en nuestro laboratorio siguiendo procedimientos estándares (51).

La tipificación del gen DQA1 se realizó con el estuche comercial "Amplitype HLADQA1" de Perkin Elmer. Para la hibridación reversa en mancha también se utilizaron EDTA, SDS, NaCl, fosfato monosódico, ácido cítrico y citrato de sodio, de Sigma Chemical Company y peróxido de hidrógeno de TJ Baker (San Antonio, TX, EUA).

2.1.4 Material

Los tubos de microcentrífuga de 0.5, 1.5 y 2.0 ml, las puntillas de 0.010, 0.2 y 1.0 ml para las micropipetas de precisión, los tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 ml y los guantes de látex fueron comprados a Cel Associates (Houston, Tx, EUA). Las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20, 200 y 1000 μ l fueron de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA). También se utilizó una pipeta repetidora Eppendorf (Westbury, NY, EUA).

2.1.5 Equipo

En el aislamiento de DNA se utilizó una centrífuga clínica de mesa Beckman TJ6, un vortex modelo 37600 de Thermolyne (Dubuque, Iowa, USA), una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Camibh, Göttingen, Germany) y una microcentrífuga Eppendorf modelo 5412.

Para analizar los productos amplificados de la PCR se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal Fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras verticales de 20x20 cms y una fuente de poder de Gibco-BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, EUA).

Para analizar los geles, tanto de agarosa como los de poliacrilamida, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa Molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

2.1.6 Apoyo computacional

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo AcerPower P75 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de

una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD). Los periféricos compatibles para Macintosh utilizados fueron: Modem Global Village Communication Inc. Modelo eleport/Silver A801 (East Middlefield Road Mountain View, Ca., EUA); digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.).

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 97* (1983-1997 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point 97* (1987-1997 Microsoft Corporation), Adobe Photoshop *Limited Edition 2.5.1* (1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.). El programa utilizado para comunicación en la red fue el Netscape 2.0.

Los programas computacionales de Biología Molecular empleados fueron: *Amplify* versión 1.2b (Bill Engels 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA), *Oligo* versión 4.0 (1992, Plymouth, Mn, EUA), *Molecular Analyst 1997* (BIO RAD). *Graphic Converter* versión 2.7 (US) (1997, Shareware, ThorstenLemke).

Los programas utilizados por vía Internet en un servidor remoto fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); *BLAST Network Service* (Blaster) y *Retrieve* [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], *GenBank* (ICEGEB, Trieste, Italia).

2.2 Estrategia experimental general

Para cumplir los objetivos planteados se siguió la estrategia general ilustrada y detallada a continuación (Figura 3).

1. Se recolectaron un total de 103 muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante, de cada una se extrajo el DNA genómico con la técnica TSNT y se formó un banco.
2. Se estimó la calidad y cantidad de cada DNA en geles de agarosa al 0.8%.
3. Se amplificaron las regiones correspondientes a los marcadores a analizar: D1S80, Apo B y HLADQA1, por PCR y utilizando los iniciadores respectivos para cada uno.
4. Se verificó el éxito del PCR sometiendo el producto amplificado a electroforesis en gel de agarosa al 2%.
5. En el caso de los VNTR's Apo B y D1S80, la resolución de los fragmentos se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida discontinuos, teñidos con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta.
6. Se generaron imágenes digitalizadas utilizando el equipo de fotodocumentación Gel Doc y se analizaron con el programa computacional Molecular Analyst.
7. En el caso de HLADQA1, se realizó la hibridación reversa en mancha del producto amplificado con sondas oligo-alelo-específicas.
8. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada marcador genético.

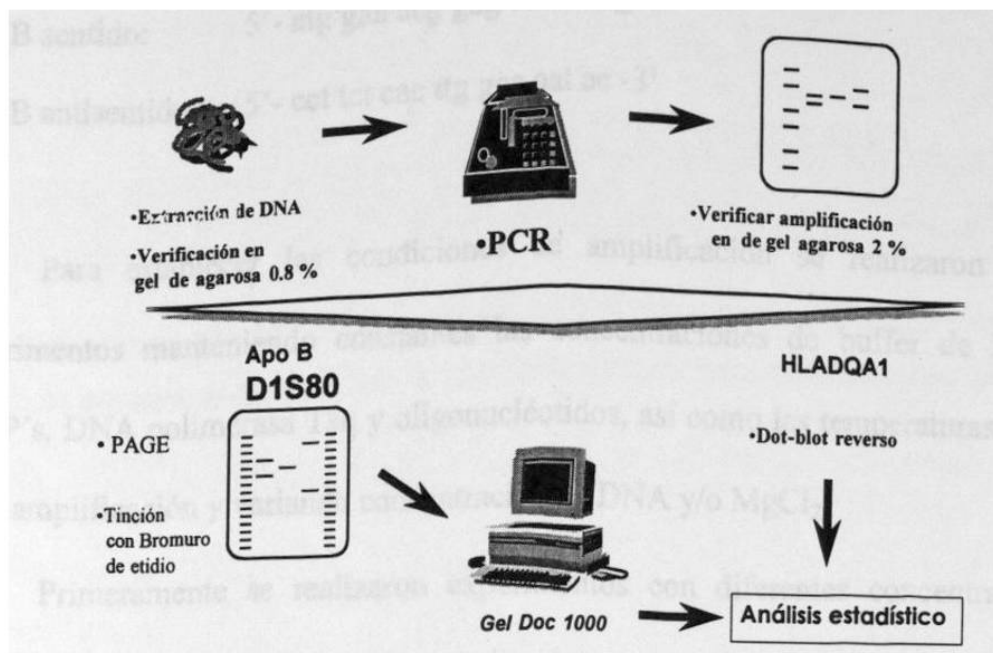


Figura 3. Estrategia experimental general. Se ilustran los pasos experimentales realizados en este trabajo para analizar los marcadores genéticos Apo B, D1S80 y HLADQA1.

2.3 Métodos

2.3.1 Estudio de los marcadores genéticos D1S80, Apo B y HLADQA1

2.3.1.1 Marcador genético Apo B

2.3.1.1.1 Optimación de las condiciones de amplificación. Para la amplificación por PCR del marcador genético Apo B, primeramente se realizó la optimación de los parámetros de PCR como son: concentración de DNA, temperaturas y tiempos óptimos, concentración de $MgCl_2$, concentración de iniciadores, etc.

Para la amplificación de la región minisatélite del gen de Apo B se sintetizaron en nuestro laboratorio los iniciadores descritos por Boerwinkle y cols (52):

Apo B sentido: 5'- atg gaa acg gag aaa tta tg -3'

Apo B antisentido: 5'- cct tct cac ttg gca aat ac -3'

Para establecer las condiciones de amplificación se realizaron diferentes experimentos manteniendo constantes las concentraciones de buffer de la enzima, dNTP's, DNA polimerasa Taq y oligonucleótidos, así como las temperaturas y tiempos de la amplificación y variando concentración de DNA y/o MgCl₂.

Primeramente se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de MgCl₂, de un mínimo de 1.0 mM hasta un máximo de 2.5 mM, utilizando 1 µg de DNA y condiciones estándares de amplificación.

En seguida se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de DNA desde 0.2 ng/µl hasta 100 ng/µl (10 ng a 5 µg de DNA por reacción de 50 µl) en condiciones estándares de amplificación y con 1.5 mM de MgCl₂, ya que el experimento anterior demostró una mejor amplificación con esta concentración de MgCl₂. Los resultados se analizaron en geles de agarosa al 2%.

2.3.1.1.2 Amplificación de las muestras para el marcador Apo B. Las muestras se amplificaron con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente y descritas en las Tabla 1 y 2.

Tabla 1**Reacción de PCR para el marcador genético Apo B**

Reactivo	Cantidad μ l	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10 μ M	2.5	1 μ M
Primer antisentido 10 μ M	2.5	1 μ M
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 10 mM	0.5	0.2 mM
DNA pol Taq 5U/ μ l	0.3	0.06 U/ μ l
DNA 50 ng/ μ l	2.0	4 ng/ μ l
Volumen de reacción	25	(100 ng por Rx)

Tabla 2**Condiciones de amplificación para Apo B**

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 ciclo	94	5
26 ciclos	94	1
	58	6

2.3.1.1.3 Verificación de la amplificación en gel de agarosa. Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TBE por espacio de 3h, se tiñó con bromuro de etidio al 0.3 μ g/ml y se observó en un equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 (Bio Rad Laboratories)

2.3.1.1.4 Resolución de los fragmentos amplificados. Los productos amplificados obtenidos se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles discontinuos de poliacrilamida (gel concentrador al 3% y gel de resolución al 8 %; ver Tabla 3). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical de 20x20 cms con peine de teflón de 20 carriles y 0.8 mm de espesor. Los vidrios utilizados se lavaron perfectamente con jabón, etanol y agua destilada. Una vez secos, se colocó una capa de silicón (sigmacote) utilizando una torunda de algodón y se dejó secar al aire. Se acomodaron los vidrios y los separadores y se sellaron los lados con cinta plástica. Se preparó la mezcla para 13 cm del gel de resolución, se vació y se dejó polimerizar; enseguida se vació otra mezcla para 3 cm del gel concentrador, se colocó el peine y se dejó polimerizar. Se colocaron 5 µl de cada producto amplificado y 1 µl de jugo azul 6X en cada carril, se colocaron como referencia los marcadores de peso molecular pBR322 digerido con la enzima de restricción *Alu* I y un marcador tipo escalera de fragmentos de 100 pb. La electroforesis se realizó en buffer de Tris-sulfato 9 mM, Acido bórico 90 mM y EDTA 2 mM, a pH 9.0 y se corrió por espacio de 5 h a 200 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 0.3 µg/ml de reciente preparación y se observaron en el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000.

Tabla 3**Preparación del gel discontinuo de poliacrilamida**

Gel concentrador (40 ml)		
Reactivo	Volumen (ml)	Concentración final
Acrilamida 40%	8.0	8% Acrilamida 0.1 % Bisacrilamida
Glicerol	2.80	7%
Tris-sulfato 1M pH=9	1.32	33 mM
Agua ultrapura	27.14	
TEMED	0.067	
Persulfato de Amonio 10%	0.670	
Gel de resolución (15 ml)		
Reactivo	Volumen (ml)	Concentración final
Acrilamida 40%	1.13	3% Acrilamida 0.1 % Bisacrilamida
Glicerol	1.05	7%
Tris-sulfato 1M pH=9	0.495	33 mM
Agua ultrapura	12.05	
TEMED	0.025	
Persulfato de Amonio 10%	0.250	

2.3.1.1.5 Análisis de imagen y tipificación de alelos Apo B. El análisis de los geles se realizó generando imágenes digitalizadas con el equipo Gel Doc 1000 utilizando una integración entre 2 y 4 segundos, dependiendo de los resultados electroforéticos obtenidos. Con el programa computacional Molecular Analyst, se calculó el tamaño en pb de los fragmentos obtenidos mediante Analisis de Volumen, tomando como estándares de referencia los tamaños de los marcadores de DNA, pBR322 digerido con *Afu* I y la escalera de 100 pb. Una vez conociéndose el tamaño de los fragmentos provenientes de la amplificación de los alelos Apo B, se aplicó la siguiente formula (53):

$$\text{Alelo Apo B} = \frac{(\text{pb} - \text{NRS})}{15} + 4$$

15

Donde:

pb = es el tamaño en pb del fragmento amplificado.

NRS= es la longitud de las secuencias no repetitivas de los extremo 5' y 3' en el producto amplificado en este caso de acuerdo a los primers utilizados es de 150 pb.

4 = se suman 4 pb por una única repetición de 11 pb presente en los alelos Apo B.

15 = es el tamaño en pb de la secuencia repetitiva.

En la figura 4 se describe un ejemplo de la tipificación en la microcomputadora de Apo B.

```

atggaacggagaattatg gagga atatttgcg aaattattt aaagatgag gtaattgtg
ttttataat  taatatttt ataattaaa ttttataat taatatttt ataattaaa ttttataat taatatttt
ataattaaa ttttataat taatatttt ataattaaa ttttataat taatatttt ataattaaa ttttataat
taatatttt ataattaaa ttttataat taatatttt ataattaaa ttttataat taatatttt ataattaaa
tgttataat taatatttt ataattaaa tgttataat tacatatttt ataattaaa tgttataat tacatatttt
ataattaaa tgttataat tacatatttt ataattaaa tgttataat tacatatttt ataattaaa tgttataat
tacatatttt ataattacat attttataa gtatttataa ttacatatt tataattaaa gtatttataa ttacatatt
tataattaaa gtatttataa ttacatatt tataattcaa ttttataa ta
gttaaaa tacagggaaa aaattaaaa gacagetta tgaatctcag gaatt gtatttccaagtgagaagg

```

Fragmento amplificado= 671 pb

$$\text{Alelo Apo B} = \frac{(671 - 150)}{15} + 4 = 35$$

Figura 4 Ejemplo de la tipificación de Apo B. Se obtuvo del *GenBank* la secuencia que contiene la región VNTR en el extremo 3' del gen de Apo B (clave de acceso J02775) reportada por Huang y Breslow en 1987 (54). A partir de ésta se realizó la simulación del PCR con el programa *Amplify*. Se ilustra la secuencia del producto amplificado (de 671 pb), las secuencias donde se aparean los iniciadores sentido y antisentido encerrados en bloques, con letras itálicas y subrayadas, la secuencia no repetitiva de los extremos 5' y 3' del producto amplificado (150 pb, incluyendo los iniciadores). También se incluye la fórmula para calcular el alelo Apo B respectivo, que en este caso es el alelo Apo B de 35 repeticiones.

2.3.1.2 Marcador genético D1S80

2.3.1.2.1 Optimación de las condiciones de amplificación. Para la amplificación por PCR del marcador genético D1S80, primeramente se realizó la optimación de los parámetros de PCR, como son: concentración de DNA, temperaturas y tiempos óptimos, concentración de MgCl₂, concentración de iniciadores, etc.

Para amplificar la región VNTR D1S80. Se utilizaron los iniciadores descritos por Kasai *et al* (34):

D1S80 sentido= 5'-gaa act ggc etc caa aca ctg ccc-3'

D1S80 antisentido= 5'-gtc ttg ttg gag atc cac gtg ccc-3'

Para establecer las condiciones de amplificación se realizaron diferentes experimentos manteniendo constantes las concentraciones del buffer de la enzima, los dNTP's, la DNA polimerasa Taq y los iniciadores, así como las temperaturas y tiempos de la amplificación y variando concentración de DNA y/o MgCl₂ en un volumen de reacción de 25 µl.

Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de MgCl₂, de un mínimo de 0.5 mM hasta un máximo de 2.5 mM, utilizando 10 ng/µL de DNA y condiciones estándares de amplificación.

En seguida se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de DNA desde 0.8 hasta 6 ng/µl (20 ng a 150 ng de DNA) en condiciones estándares de amplificación y a concentraciones de 1 y 1.5 mM de MgCl₂, respectivamente, tomando

como referencia los resultados de la titulación previa. Los resultados de estos experimentos se analizaron en geles de agarosa al 2%.

2.3.1.2.2 Amplificación de las muestras con el marcador D1S80. La amplificación del marcador genético D1S80 se realizó bajo condiciones óptimas de reacción descritas en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4

Reacción de PCR para el marcador genético D1S80

Reactivo	Cantidad μl	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10 μM	2.5	1 μM
Primer antisentido μM	2.5	1 μM
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTP's 10 mM	0.5	0.2 mM
DNA pol Taq 5U/ μl	0.3	0.06 U/ μl
DNA 50 ng/ μl	2.0	4 ng/ μl
Volumen de reacción	25.0	

2.3.1.2.3 Verificación de la amplificación en gel de agarosa. Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TBE por espacio de 3h, se tiñó con bromuro de etidio al 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se observó en el equipo Gel Doc 1000.

Tabla 5**Condiciones de amplificación para D1S80**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 ciclo	94	5
30 ciclos	94	1
	65	1
1 ciclo	72	1
	72	7

2.3.1.2.4 Resolución de los fragmentos amplificados. Los productos amplificados de D1S80 se resolvieron siguiendo el mismo procedimiento y condiciones electroforéticas empleadas para Apo B. Solo que en este caso, los marcadores de referencia de tamaño utilizados fueron el DNA de pBR322 digerido con la enzima *Alu I*, un marcador tipo escalera de 100 pb y el marcador alélico de D1S80. La electroforesis se realizó en buffer de Tris-Sulfato 9 mM, Acido bórico 90 mM y EDTA 2 mM, a pH 9.0 y se corrió por espacio de 5 hrs a 200 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 0.3 µg/ml recién preparado y se observaron en el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000.

2.3.1.2.5 Análisis de los patrones electroforéticos y tipificación. Para analizar los geles se generaron imágenes digitalizadas con el equipo Gel Doc 1000 y el programa computacional Molecular Analyst, la tipificación de cada muestra se realizó por comparación teniendo como referencia el marcador alélico D1S80 y el marcador de tamaño pBR322 digerido con la enzima *Alu I*.

2.3.1.3 Marcador genético HLADQA1.

2.3.1.3.1 Amplificación de las muestras con el marcador HLADQA1. La tipificación del gen HLADQA1 se realizó con el estuche comercial AmpliType de Perkin Elmer que contiene los iniciadores GH26 y GH27 (56) que incluyen biotina y que amplifican un fragmento de 242 ó 238 pb. Las condiciones de amplificación se describen en las tablas 6 y 7.

Iniciador sentido GH26: 5'-gtg tgc cag gtg taa act tgt acc ag-3'

Iniciador antisentido GH27: 5'-cac gga tcc ggt agc agc ggt aga gtt g-3'

2.3.1.3.2 Verificación de la amplificación: Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio a 0.3 µg/ml y se observaron con luz ultravioleta.

Tabla 6

Reacción de PCR para HLADQA1

Reactivo	Cantidad µl
Mezcla de reacción	25
MgCl ₂ 8 mM	25
DNA 50 ng/µl	3
Volumen de reacción	53

Tabla 7**Condiciones de amplificación para HLADQA1**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
32 ciclos	94	60 seg
	60	30 seg
	72	30 seg
1 ciclo	72	7 min

2.3.1.3.3 Tipificación por hibridación reversa en mancha. Los productos amplificados obtenidos fueron tipificados realizando hibridación reversa en mancha con sondas oligo-alelo específicas inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa para 6 alelos de DQA1, para lo que se siguió el siguiente procedimiento:

Primeramente, se desnaturalizaron los productos amplificados biotinilados a 95° por espacio de 5 min. en un termociclador. Se colocaron 35 µl de cada producto amplificado en una charola de tipificación junto con 3 ml de solución de hibridación y conjugado enzimático estreptavidina –peroxidasa. La hibridación se llevó a cabo a 55°C y con agitación constante de 50 rpm por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de hibridación, se realizaron dos lavados, uno a temperatura ambiente y uno a 55° C y 50 rpm por 12 min. Se retiró la solución y nuevamente se lavaron las membranas a temperatura ambiente por algunos segundos. Se eliminó la solución y se agregó a cada tira, buffer de citratos pH 5, se agitó a temperatura ambiente por 5 min a 50 rpm. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución y se agregó la solución de desarrollo de color conteniendo el cromógeno TMB y peróxido de hidrógeno. La charola se cubrió

con papel aluminio y se agitó a 50 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente hasta observar un precipitado azul (5 a 10 min). Se retiró la solución, se agregó agua destilada para detener la reacción y se agitó por 5 min a 50 rpm, se repitió este último paso una vez más. Se retiró el agua y se dejaron secar las membranas.

2.3.2 Muestra analizada y obtención de DNA

2.3.2.1 Muestra analizada

Se analizó una muestra de 103 individuos sanos, hombres y mujeres, no emparentados, con niveles normales de glucosa y plomo, con edad comprendida entre 18 y 43 años y siendo sus cuatro abuelos nacidos en México.

Se realizaron entrevistas personales por medio de encuestas a 103 personas de diferentes unidades del Instituto Mexicano del Seguro Social en el área metropolitana de Monterrey y en las escuelas preparatorias y facultades de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

El tamaño de la muestra y el potencial estadístico de este estudio se determinó utilizando el criterio de Chakraborty (57) y Chakraborty y Zhong para VNTR's (58).

Los criterios que se tomaron para las personas que participaron en el estudio fueron:

- a) Que estuvieran aparentemente sanas.
- b) Que las edades oscilaran entre los 14-43 y 44-73 años.
- c) Que no tuvieran parentesco con otros participantes del estudio.
- d) Que conocieran el lugar de nacimiento de sus cuatro abuelos.

A cada persona se le explicó el propósito del estudio y se le pidió su colaboración voluntaria para encuestarlo y tomarle una muestra de sangre periférica.

2.3.2.2 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre

Se extrajo el DNA genómico mediante la técnica de TSNT (Tritón-SDS-NaCl-Tris), que consiste en la lisis simultánea de las células sanguíneas utilizando los detergentes Tritón X-100 y SDS; el DNA se purificó posteriormente por extracciones con fenol-cloroformo y finalmente se recuperó por precipitación con etanol. El procedimiento que se siguió fué el siguiente:

Se colocaron 2.5 ml de sangre en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml. Las células se lisaron con 1 ml de buffer de lisis TSNT, mezclando por varios segundos. Posteriormente se agregaron 2.5 ml de fenol saturado y 1 ml de C:AI; el contenido del tubo se homogenizó por completo utilizando un vortex. En seguida se agregaron 2 ml de buffer TE y se centrifugó a 10 000 rpm por espacio de 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se agitó lentamente por inversión hasta observar el DNA precipitado, como una hebra blanca. Se recuperó el DNA con una puntilla de polipropileno de 1000 µl y se transfirió con cuidado a un tubo eppendorf de 2.0 ml. Se centrifugó a 14 000 rpm en una microcentrífuga y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70 %. Se centrifugó nuevamente. Se decantó el etanol, se secó el DNA y finalmente se resuspendió en TE.

2.3.2.3 Verificación de la calidad y la concentración del DNA

Se realizaron diluciones 1:10 de cada DNA para verificar su cantidad e integridad en geles de agarosa al 0.8 %, utilizando estándares de DNA (bacteriófago Lambda) de concentración conocida.

2.3.3 Análisis estadístico de los resultados

2.3.3.1 Frecuencia Alélica

La frecuencia alélica se estimó con el método de conteo genético de Li, éstas fueron estimadas mediante máxima verosimilitud (58).

2.3.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para determinar si las frecuencias genotípicas están dentro de los valores esperados en base a las frecuencias alélicas encontradas y saber si se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, se realizaron tres procedimientos:

- 1) La prueba de X^2 basada en la heterocigocidad total del locus.
 - 2) La prueba de Índice de Verosimilitud de Weir
 - 3) La prueba exacta de Guo y Thompson
- (59, 60)

2.3.3.3 Nivel de significancia

Para cada una de las pruebas, los niveles de significancia se determinaron empíricamente mediante un método de simulación basado en permutación (61, 62, 63).

2.3.3.4 Heterocigosidad

La diversidad alélica (heterocigosidad) fué calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$H = [1 - \sum X_i^2] [n / n - 1]$$

Donde:

ΣX_i^2 = sumatoria de los cuadrados de las frecuencias relativas de cada uno de los diferentes alelos encontrados.

N= tamaño de la muestra (número total de alelos posibles), en este caso n= 206

(56).

2.3.3.5 Poder de Discriminación (PD)

El poder de discriminación fué determinado mediante la formula:

$$PD= 1-\Sigma P_i^2$$

Donde:

ΣP_i^2 = sumatoria de los cuadrados de las frecuencias relativas de los genotipos diferentes encontrados (64).

2.3.3.6 Probabilidad de Coincidencia al azar (PCA)

La probabilidad de coincidencia al azar entre los genotipos de dos individuos para un marcador dado, se calculó con la siguiente formula:

$$PCA= \underline{q}^2 (2-\underline{q})$$

donde:

\underline{q} = frecuencia alélica media (FAM)

y la PCA para los tres marcadores en conjunto se obtuvo multiplicando la PCA

individual de los tres marcadores. Nota: Esta prueba indica la probabilidad de que 2

individuos sin parentesco familiar tengan al azar un genotipo idéntico (65, 56).

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Marcador Genético Apo B

3.1.1 Optimación de la reacción de PCR

Los experimentos realizados permitieron establecer las condiciones óptimas de amplificación, siendo la cantidad de DNA y la concentración del ion magnesio factores importantes en la formación de los productos de amplificación inespecíficos (exceso de DNA y/o Mg^{+2}) o bien en la amplificación deficiente (poco DNA y/o Mg^{+2}), respectivamente.

Al titular la cantidad del ion magnesio en la PCR se observó que no había un efecto directo, ya que se observó una amplificación semejante en las diferentes concentraciones ensayadas, por lo que para los experimentos posteriores se escogió la concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$.

En cambio la concentración de DNA que se debe utilizar para que la amplificación sea específica y de buena intensidad, resultó en un rango 1 a 5 ng/ μ l; concentraciones menores no producen amplificación y mayores generan bandas inespecíficas (Figura 5).

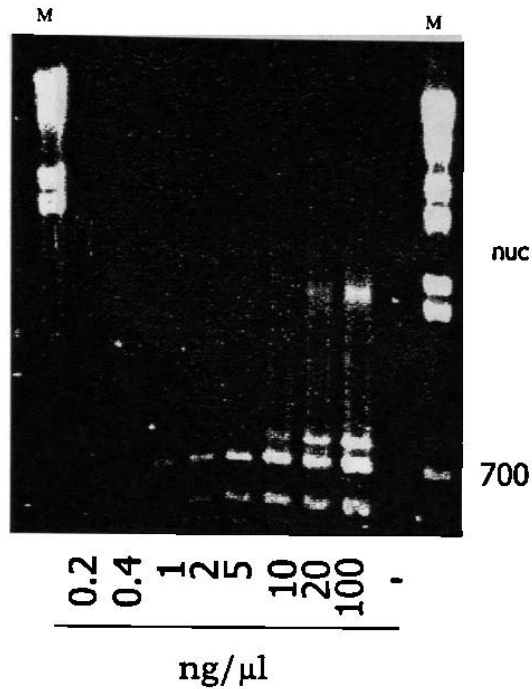


Figura 5 .Titulación de la concentración de DNA en la PCR para Apo B. Se muestra el gel de agarosa al 2% con los resultados de la amplificación a diferentes concentraciones de DNA (indicadas en la parte inferior del gel) y 1.5 mM de $MgCl_2$. Tal como se puede observar, concentraciones mayores de 5 $ng/\mu l$ dan por resultado amplificaciones de tipo inespecífico. En este caso se trata de la muestra de un individuo heterocigoto para Apo B, donde solo se deben de observar 2 bandas amplificadas.

3.1.2 Amplificación de las muestras

Se realizó la amplificación de las muestras con las condiciones óptimas encontradas y referidas anteriormante. Se verificó la amplificación de éstas en geles de agarosa al 2% (Figura 6) y posteriormente se realizó la tipificación de éstas en geles de poliacrilamida, con un ejemplo representativo incluido en la Figura 7.

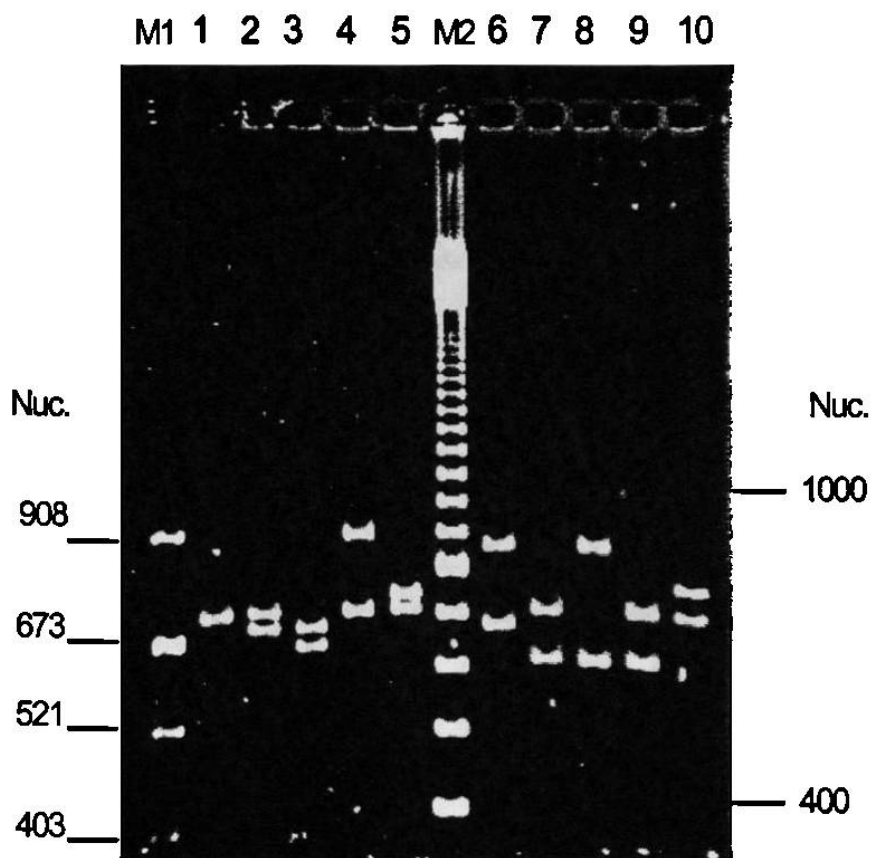


Figura 6. Genotipificación de Apo B. Se muestra un gel de agarosa al 2% para verificar la amplificación del marcador Apo B en los DNAs de 10 individuos no relacionados (carriles 1 al 10). Se incluyeron los marcadores de tamaño, M1=pBR322 digerido con la enzima *Alu I* y M2= un marcador tipo escalera de fragmentos de 100 pb. Los fragmentos amplificados de los alelos Apo B quedan comprendidos entre 563 pb y 950, pb que corresponden a los alelos de 29 hasta 51 repeticiones, respectivamente.

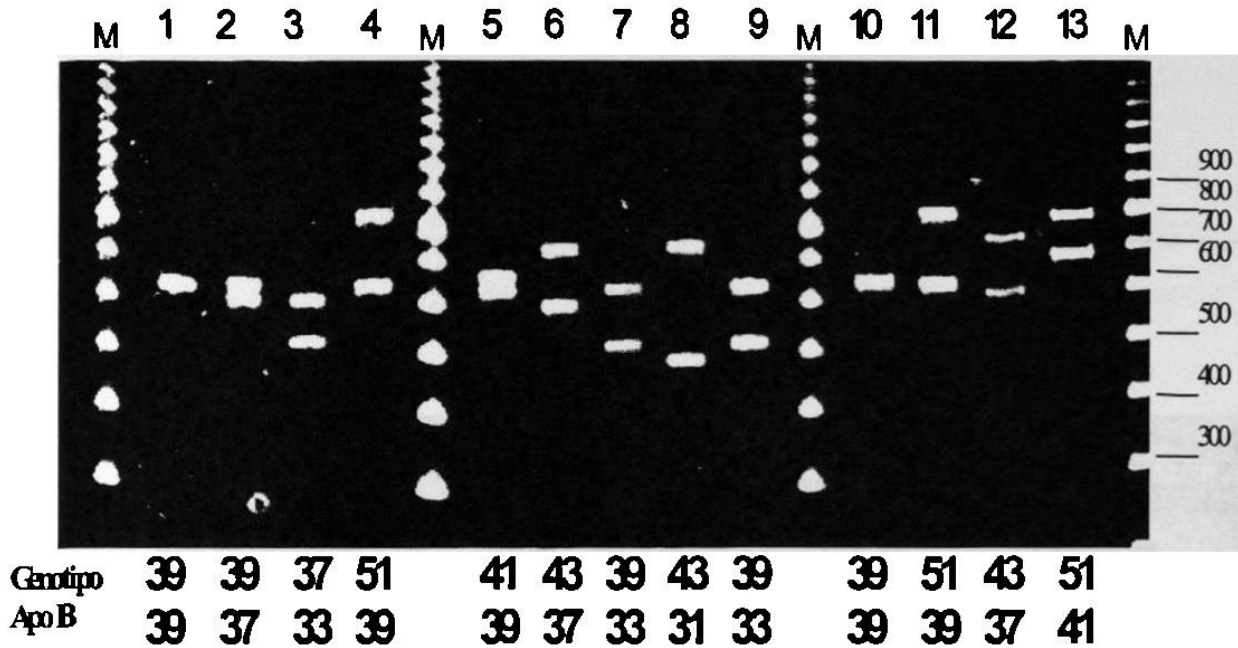


Figura 7 Gel de poliacrilamida para la resolución de los fragmentos amplificados de Apo en 13 individuos no relacionados. M: marcador tipo escalera con fragmentos de referencia de tamaño de 100 pb. En la parte inferior se indican los genotipos para Apo B de cada individuo, por ejemplo, el carril 1 corresponde a un homocigoto del alelo 39, mientras que los carriles 2, 3 y 4 son heterocigotos 39/37, 37/33 y 51/39 respectivamente.

3.1.3 Estadísticas para el marcador Apo B

Para el marcador genético Apo B, en la muestra analizada de 103 individuos, se encontraron un total de 16 alelos diferentes, siendo los más frecuentes los alelos de 37 (23.301%) y 39 (27.670%) repeticiones de la unidad repetitiva del marcador. Mientras, que los alelos de 21, 27 y 57 repeticiones fueron los menos frecuentes, cada uno con abundancia del 0.485%.

El alelo mayor encontrado fue el de 57 repeticiones, mientras que el menor fue el de 21 repeticiones.

Las frecuencias alélicas encontradas se ilustran en la figura 8.

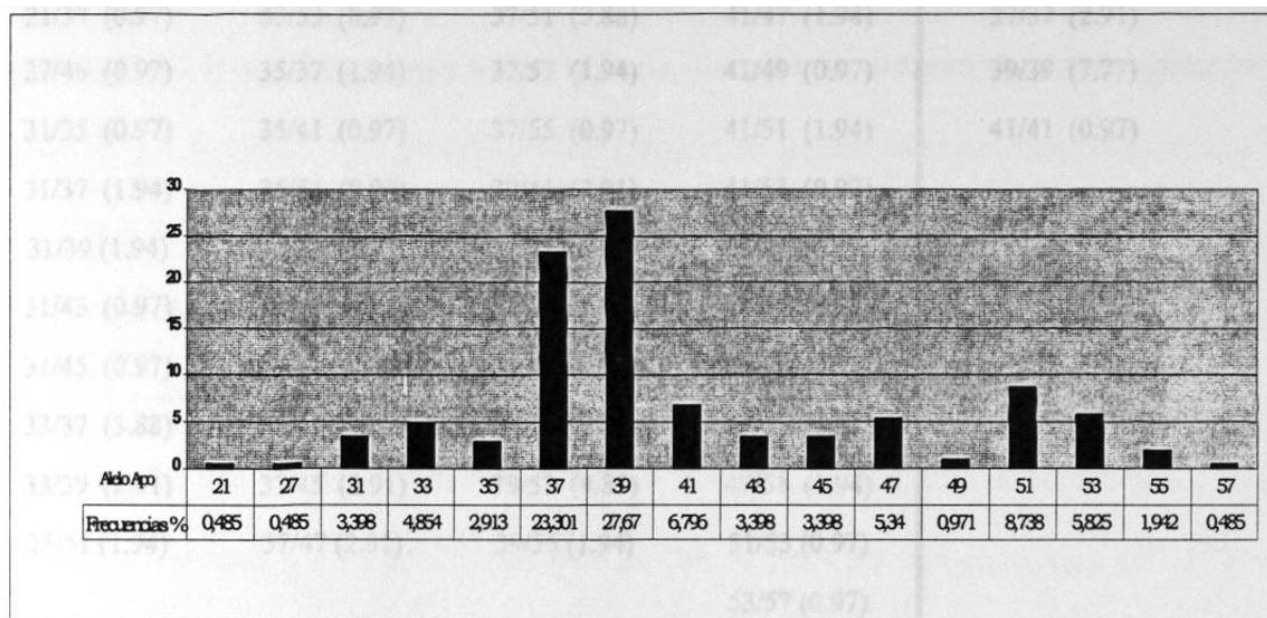


Figura 8. Frecuencias alélicas del marcador Apo B en los individuos analizados.

Se encontraron 44 genotipos diferentes, 41 heterocigotos y 3 homocigotos. El genotipo 37/39 fue el más frecuente (15.53 %) seguido del genotipo 39/39 (7.77 %), tal y como se ilustra en la tabla 8 y 9. Se tipificaron 103 individuos para ApoB; de los cuáles 91 fueron heterocigotos, mientras 12 fueron homocigotos.

Tabla 8

Frecuencias genotípicas (%) para el marcador Apo B encontradas en la muestra estudiada

Heterocigotos				Homocigotos
21/37 (0.97)	33/53 (0.97)	37/51 (3.88)	41/47 (1.94)	37/37 (2.91)
27/45 (0.97)	35/37 (1.94)	37/53 (1.94)	41/49 (0.97)	39/39 (7.77)
31/35 (0.97)	35/41 (0.97)	37/55 (0.97)	41/51 (1.94)	41/41 (0.97)
31/37 (1.94)	35/51 (0.97)	39/41 (2.91)	41/53 (0.97)	
31/39 (1.94)	35/53 (0.97)	39/43 (0.97)	41/55 (0.97)	
31/43 (0.97)	37/39 (15.53)	39/47 (2.91)	43/45 (0.97)	
31/45 (0.97)	37/41 (0.97)	39/49 (0.97)	43/47 (0.97)	
33/37 (3.88)	37/43 (2.91)	39/51 (4.85)	45/51 (0.97)	
33/39 (2.91)	37/45 (2.91)	39/53 (4.85)	47/51 (1.94)	
33/51 (1.94)	37/47 (2.91)	39/55 (1.94)	51/53 (0.97)	
			53/57 (0.97)	

Tabla 9

Números de los diferentes genotipos Apo B encontrados

Genotipos	Obs ^a .	Exp ^b	S.E. ^c
Homocigotos	3	4.1629	1.2066
Heterocigotos	41	37.9923	3.3058
Total	44	42.1553	4.0348

^a Genotipos Apo B observados

^b Genotipos Apo B esperados

^c Error estándar

3.2 Marcador genético D1S80

3.2.1 Optimización del PCR

Se amplificó el marcador D1S80 en diferentes concentraciones de $MgCl_2$ desde 0.5 mM hasta 2.5 mM. Mientras que a niveles bajos (0.5 mM) se observó la falta de producto amplificado, a niveles altos (mayores a 2.0 mM) se obtuvieron bandas inespecíficas. Los mejores resultados se lograron a concentraciones de 1 y 1.5 mM de $MgCl_2$, con una concentración de 5 ng/ μ L de DNA (Figura 9).

En seguida se realizó una titulación para conocer la concentración óptima de DNA, para obtener una buena cantidad de producto amplificado y evitar inespecificidad. La titulación realizada a 1.5 mM de magnesio mostró la amplificación específica de D1S80 desde una concentración mínima de 0.8 ng/ μ l hasta 6 ng/ μ l de DNA, obteniéndose una mayor amplificación con 4 y 6 ng/ μ l de DNA. Mientras que en la titulación de DNA realizada a 1.0 mM de Mg, solo se puede obtener amplificación con concentraciones mayores de 4 ng/ μ l y de menor intensidad que las obtenidas a 1.5 mM.

3.2.2 Amplificación de muestras

Las muestras se amplificaron con las condiciones descritas en la sección de material y métodos; se verificó la amplificación en geles de agarosa al 2% (figura 10). En general, se observó una buena resolución de los fragmentos amplificados, pero para realizar la tipificación y asignar los alelos del marcador D1S80, fue necesario resolverlos en geles de poliacrilamida discontinuos.



Figura 9. Titulación del ion magnesio en la amplificación de D1S80 por PCR. En la parte inferior del gel (de agarosa al 2%) se indican las concentraciones de MgCl₂.

D1S80

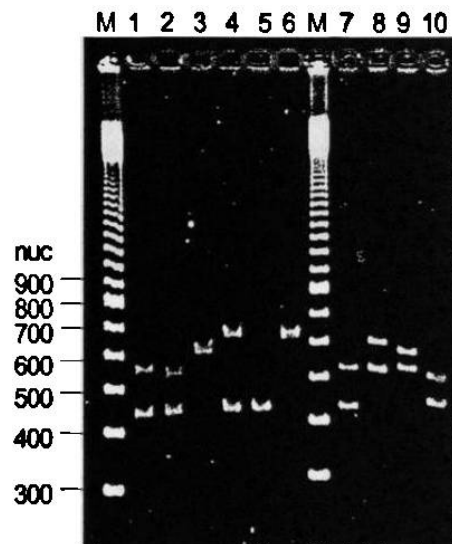


Figura 10. Amplificación del marcador genético D1S80 a partir del DNA de 10 individuos. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 2%. M, marcador de tipo escalera de fragmentos de 100 pb; 1 al 10, productos amplificados de D1S80.

3.2.3 Tipificación

La asignación de alelos se realizó utilizando el marcador alélico D1S80 (Perkin Elmer) que consiste de 27 alelos D1S80 amplificados. El alelo 14 es el de menor tamaño, la banda que le sigue corresponde al 16 y así hasta el alelo de 41 repeticiones; el alelo 15 no está incluido (Figura 11).

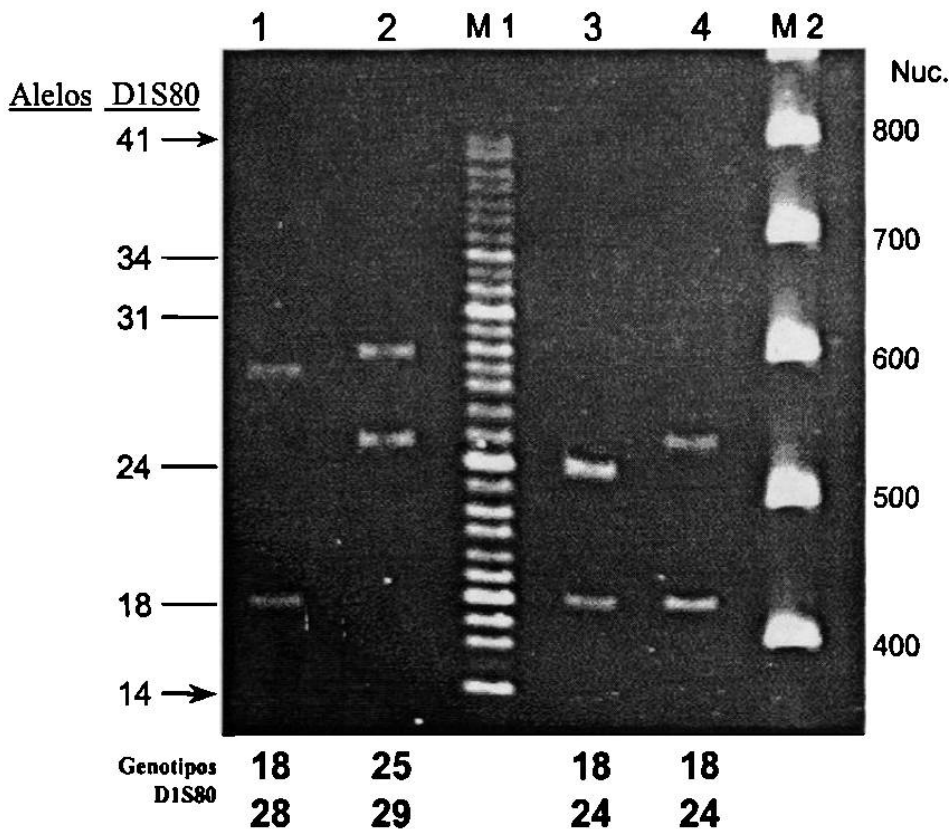


Figura 11. Tipificación de D1S80. Se muestra la fotografía del gel de poliacrilamida al 8%, teñido con bromuro de etidio e irradiado con luz ultravioleta, donde se realizó la tipificación del marcador D1S80. M1, marcador alélico D1S80; M2, marcador tipo escalera de 100 pb; 1 al 4 productos amplificados a partir del DNA de cuatro individuos diferentes, indicándose en la parte inferior los genotipos D1S80 correspondientes a cada uno.

3.2.4 Análisis estadístico de D1S80

Para D1S80, en la muestra analizada de 103 individuos, se encontraron un total de 20 alelos diferentes, siendo los más frecuentes los alelos de 18 (23.301%) y 24 (20.388%) repeticiones o copias de la unidad repetitiva del marcador. Mientras, que los alelos de 17, 36 y 41 repeticiones fueron los menos frecuentes, cada uno con abundancia del 0.485%.

El alelo mayor encontrado fué el de 41 repeticiones, mientras que el menor fué el de 15 repeticiones.

Las frecuencias alélicas encontradas se ilustran en la Figura 12.

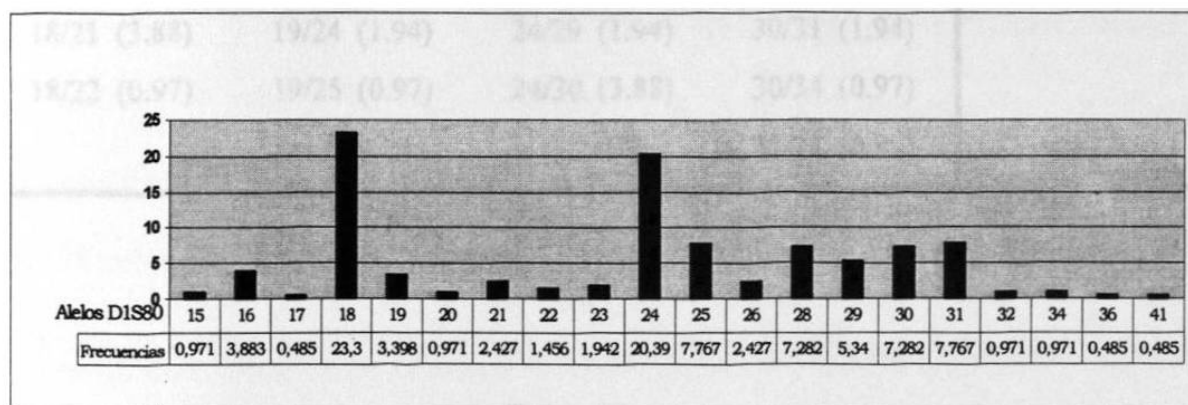


Figura 12.. Frecuencias alélicas del marcador D1S80 en los individuos analizados.

Se encontraron 53 genotipos diferentes, 49 heterocigotos y 4 homocigotos. El genotipo 18/24 fué el más frecuente (9.71 %) seguido del genotipo 24/24 (5.83 %). Se tipificaron 103 individuos para D1S80; de los cuáles 89 fueron heterocigotos, mientras 14 fueron homocigotos (Tabla 10 y 11).

Tabla 10**Frecuencias genotípicas (%) del marcador D1S80 encontradas en la muestra estudiada**

Homocigotos				Heterocigotos
15/18 (0.97)	18/23 (0.97)	19/26 (0.97)	24/31 (2.91)	18/18 (4.85)
15/24 (0.97)	18/24 (9.71)	19/31 (0.97)	25/28 (0.97)	24/24 (5.83)
16/18 (0.97)	18/25 (1.94)	20/24 (0.97)	25/29 (2.91)	28/28 (1.94)
16/19 (1.94)	18/26 (0.97)	20/25 (0.97)	25/30 (0.97)	30/30 (0.97)
16/23 (0.97)	18/28 (4.85)	21/25 (0.97)	25/31 (0.97)	
16/26 (0.97)	18/29 (2.91)	22/25 (1.94)	25/32 (1.94)	
16/29 (0.97)	18/30 (1.94)	23/24 (0.97)	26/29 (0.97)	
16/30 (0.97)	18/31 (4.85)	23/31 (0.97)	26/30 (0.97)	
16/31 (0.97)	18/36 (0.97)	24/25 (0.97)	28/30 (0.97)	
17/24 (0.97)	18/41 (0.97)	24/28 (3.88)	29/31 (0.97)	
18/21 (3.88)	19/24 (1.94)	24/29 (1.94)	30/31 (1.94)	
18/22 (0.97)	19/25 (0.97)	24/30 (3.88)	30/34 (0.97)	
			31/34 (0.97)	

Tabla 11**Números de los diferentes genotipos D1S80 encontrados**

Genotipos	Obs ^a	Exp ^b	S.E. ^c
Homocigotos	4	4.4895	1.2616
Heterocigotos	49	45.7288	13.6979
Total	53	50.2183	4.7393

^a Genotipos Apo B observados^b Genotipos Apo B esperados^c Error estándar

3.3 Marcador genético HLADQA1

3.3.1 Amplificación de las muestras por PCR

Tratándose éste de un estuche comercial, las muestras se amplificaron con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos sin problema alguno y los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 2%.

3.3.2 Tipificación por hibridación reversa en mancha

El producto amplificado de HLADQA1 se tipificó mediante hibridación reversa en mancha. Se realizó la lectura de cada tira y se determinaron los genotipos correspondientes; todo esto también sin necesidad de cambiar el protocolo y las condiciones recomendadas por el fabricante. Es importante señalar que con el estuche empleado se pueden identificar 6 de ocho alelos DQA1 ya que los alelos 0401, 0501 y 0601 (4.2, 4.1 y 4.3) se detectan juntos como alelo 4. La combinación de los 6 alelos origina un máximo de 21 genotipos diferentes (Figura 13).

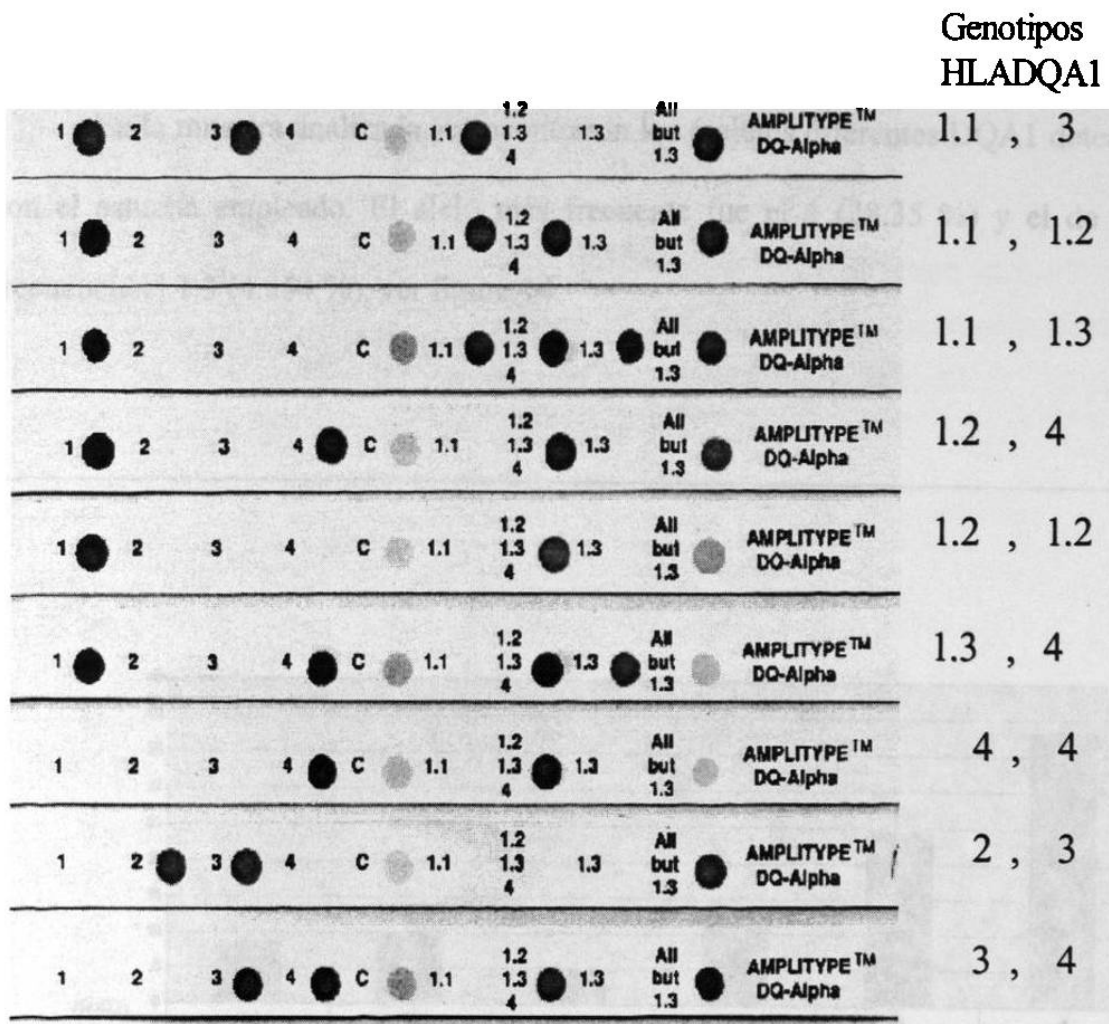


Figura 13. Tipificación con el estuche del marcador HLADQA1. Se ilustran los resultados de la hibridación reversa en mancha de los productos amplificados del gen HLADQA1 de 9 individuos no relacionados, indicándose los genotipos obtenidos para cada caso.

3.3.3 Análisis estadístico de HLADQA1

En la muestra analizada se encontraron los 6 alelos diferentes DQA1 detectables con el estuche empleado. El alelo más frecuente fue el 4 (38.35 %) y el de menor frecuencia el 1.3 (4.854 %), ver figura 14.

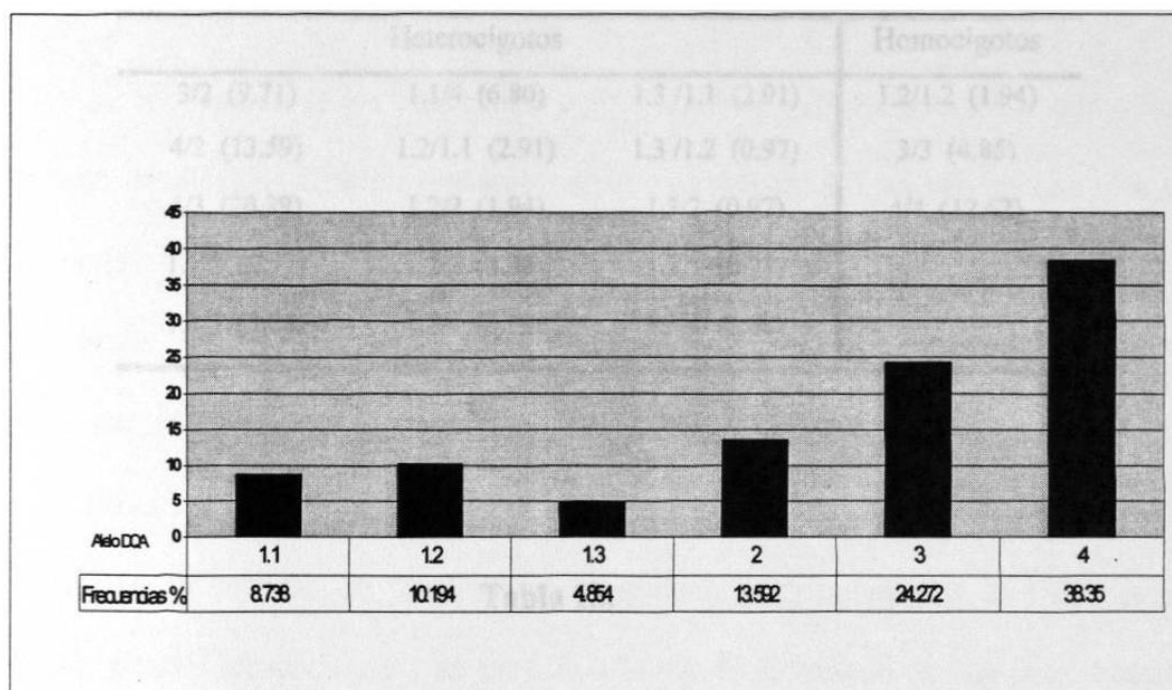


Figura 14. Frecuencias alélicas del marcador HLADQA1 en los individuos analizados.

La combinación de los 6 alelos origina en total 21 genotipos diferentes y en la muestra analizada se observaron sólo 18, de los cuales 3 fueron homocigotos y 15 heterocigotos. Los genotipos que no se encontraron fueron los homocigotos para el alelo 2, 1.1 y 1.3. El genotipo 3/4 fue el más frecuente (20.39 %), mientras que los genotipos menos frecuentes fueron el 2/1.1, 2/1.3, el 3/1.3 y el 1.2/1.3 (0.97 % cada uno). Se

tipificaron 103 individuos para HLADQA1 de los cuáles 83 resultaron heterocigotos y 20 fueron homocigotos (Tablas 12 y 13)

Tabla 12.

Frecuencias genóticas (%) del marcador HLADQA1 en la muestra estudiada.

	Heterocigotos		Homocigotos
3/2 (9.71)	1.1/4 (6.80)	1.3 /1.1 (2.91)	1.2/1.2 (1.94)
4/2 (13.59)	1.2/1.1 (2.91)	1.3 /1.2 (0.97)	3/3 (4.85)
4/3 (20.39)	1.2/2 (1.94)	1.3/2 (0.97)	4/4 (12.62)
1.1/2 (0.97)	1.2/3 (3.88)	1.3/3 (0.97)	
1.1/3 (3.88)	1.2/4 (6.80)	1.3/4 (3.88)	

Tabla 13.

Números de los diferentes genotipos HLADQA1 encontrados

Genotipos	Obs ^a	Exp ^b	S.E. ^c
Homocigoto	3	4.2722	0.8707
Heterocigot	15	13.5496	1.0016
Total	18	17.8219	1.3515

^a Genotipos Apo B observados

^b Genotipos Apo B esperados

^c Error estándar

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1 Tipificación de los marcadores genéticos

Apo B, D1S80 y HLADQA1

La tipificación de los marcadores Apo B, D1S80 y HLADQA1 en el laboratorio mediante técnicas de biología molecular resultó satisfactoria. Una vez encontrados los parámetros óptimos y siguiendo un estricto control de calidad en la preparación y el almacenaje de los reactivos y durante el desarrollo de cada una de las técnicas empleadas, la tipificación se llevo a cabo sin contratiempos.

En el caso de Apo B y D1S80, marcadores de naturaleza VNTR, se debe tener cuidado en la cantidad de DNA que se amplifica, pues un exceso de DNA puede originar bandas inespecíficas y su escases o impureza redundará en una amplificación de poco rendimiento. Las condiciones señaladas en la sección de material y métodos para la amplificación de los marcadores generan buenos resultados de amplificación, pero es posible encontrar otras condiciones ya que parámetros como son la concentración de los iniciadores y de la enzima, así como las condiciones del buffer, no se modificaron. Posiblemente con estas nuevas condiciones la cantidad de DNA requerida para el estudio de estos marcadores puede ser aun menor a la aquí recomendada.

Los productos amplificados de Apo B y D1S80 de la mayoría de las muestras se resolvieron en geles de agarosa al 2%. Cuando se observó una sola banda, ésta correspondió a un homocigoto o a heterocigotos donde la diferencia entre los dos alelos es mínima 1 o 2 repeticiones. Para mejorar la resolución, la tipificación final y asignación de alelos se realizó resolviendo los productos de la PCR en geles de poliacrilamida.

El equipo de fotodocumentación utilizado permitió obtener una alta sensibilidad a partir de cantidades pequeñas de producto amplificado e imágenes digitalizadas a partir de geles teñidos con bromuro de etidio, lo que no hubiera sido posible utilizando transiluminadores de luz ultravioleta convencionales. Además, gracias a lo anterior, no fué necesario teñir los geles con plata como se había contemplado en un principio. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Molecular Analyst, que en el caso de Apo B fué muy importante para calcular los tamaños en pb de los fragmentos amplificados, teniendo como referencia marcadores de tamaño determinado; y en el caso de D1S80 se comparó contra un marcador alélico.

La metodología empleada para la tipificación de HLADQA1 mediante PCR e hibridación reversa en mancha con sondas oligo-alelo específicas y detección con el sistema de biotina-estreptavidina-peroxidasa es una forma rápida y clara de tipificación. Además, la cantidad requerida mínima es de 1 ng.

4.2 Marcador genético Apo B

El locus Apo B ha sido tipificado en diferentes poblaciones utilizando diferentes técnicas de análisis. En cada uno de los casos el marcador ha resultado ser altamente polimórfico (Tabla 14).

Se han descrito 21 alelos diferentes para este locus, el número de repeticiones va desde 23 hasta 57 y los alelos, así como sus frecuencias alélicas y genotípicas, varían entre las poblaciones. A pesar de que existe información en relación a la variación alélica en poblaciones limitadas, la caracterización detallada de este polimorfismo en poblaciones de origen diverso no es muy conocida (66).

Tabla 14.

Tipificación del marcador genético Apo B en diferentes poblaciones.

Población	No. de	No. De	Heterocigosidad	Referencia
Suecos	176	13	.735	67
Alemanes	97	11	.771	66
Italianos	183	11	.784	
Blancos US	134	14	.770	68
Sikhs (India)	107	14	.777	67
Pehuences (Chile)	87	8	.713	66
Negros US	98	21	.892	68
Ewondos	97	17	.879	69
Griegos	101	12	.800	70
Australianos	318	14	.780	71
Franceses	125	12	.75	52

En un estudio realizado en un grupo de población negra de Estados Unidos, se logró detectar un máximo de 21 alelos diferentes y su heterocigosidad fue del 89% (68). En nuestro estudio se detectaron un total de 16 alelos diferentes con una heterocigosidad del 84%.

Diferentes nomenclaturas han sido utilizadas en la tipificación de Apo B: una reportada por Ludwing en 1989 (71) donde se nombran a los alelos como 30, 32, 34 y 36; en el mismo año Boerwinkle (52) nombró a estos alelos como 31, 33, 35, 37 (una unidad adicional a la de Ludwing); y la nueva nomenclatura derivada de la secuencia obtenida directamente del producto amplificado por PCR, y que agrega una repetición de dos unidades, es decir el alelo 37 de Boerwinkle ahora es el 39 y este corresponde al 36 de Ludwing. Es por esto que para comparar los resultados, se ajustaron los datos previamente reportados con la nueva nomenclatura utilizada también en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un patrón de frecuencia bimodal correspondientes a los alelos 37 y 39, además de un segundo pico de frecuencia en el alelo 51. El patrón 37-39 es característico de grupos no-africanos y ha sido reportado anteriormente por otros autores en estudios realizados en población caucásica, como los realizados por Ludwing en australianos y por Deka en canadienses, chilenos y alemanes (66, 71).

Aún se desconoce la razón que origina este patrón de frecuencia bimodal en poblaciones genéticamente tan diversas. Se cree que los diferentes alelos VNTR se derivan del entrecruzamiento disparejo entre cromátides hermanas o bien de una sobreposición durante la replicación.

En grupos africanos, como los Ewondos de Camerún y los afroamericanos (Negros de E.U.), se presenta un patrón unimodal simétrico alrededor del alelo 37, además de tener niveles más altos de heterocigosidad (89 y 87%) y un mayor número de alelos detectados (21 y 17) ver figura 15 (69, 68).

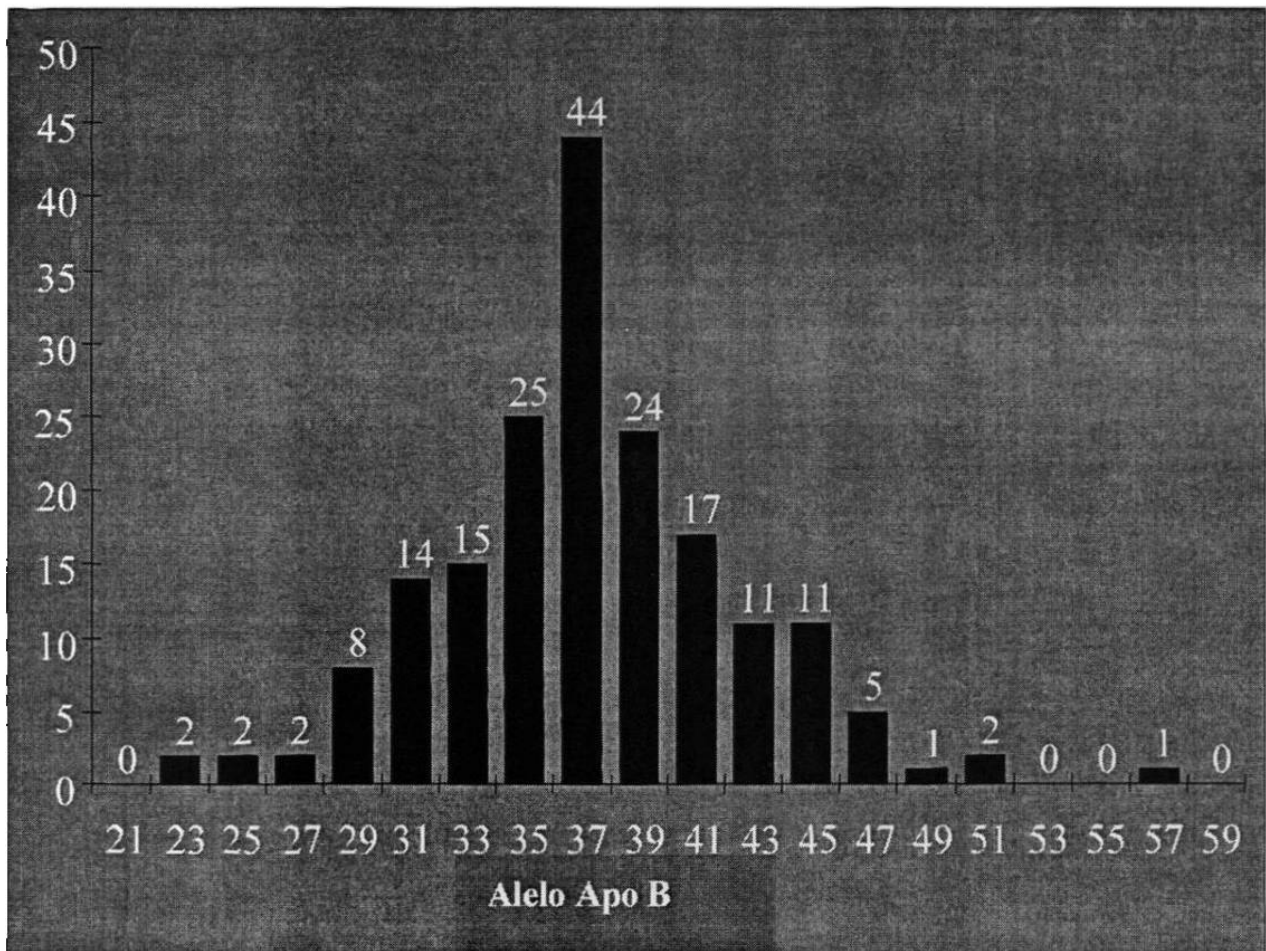


Figura 15. Frecuencias alélicas del marcador genético Apo B en una población africana.

4.3 Marcador genético D1S80

El marcador D1S80 ha sido ampliamente tipificado en diferentes poblaciones utilizando principalmente la técnica de AMP-FLP y visualizando los fragmentos por tinción con plata (72). Ha sido posible detectar un máximo de 29 alelos los que determinan 435 posibles genotipos de este marcador.

En la muestra analizada se encontraron 20 alelos diferentes, siendo los más frecuentes el de 18 y de 24 repeticiones. Estos datos coinciden con los reportados por Budowle (73) para caucásicos e hispanoamericanos. Es importante mencionar también la diferencia entre el grupo de Afroamericanos donde los alelos que se presentan con alta frecuencia son el 21 y el de 28 repeticiones. El perfil de frecuencias para caucásicos, hispanoamericanos y para la muestra del Noreste de México analizada en este trabajo presentan un patrón bimodal característico para los alelos de 18 y 24 repeticiones.

Los grupos poblacionales que han sido tipificados para D1S80, tienen características genéticas propias que los distinguen entre sí, y además de la ausencia de ciertos alelos, las del resto muestran frecuencias alélicas variables entre las poblaciones. Por ejemplo, en el caso de la muestra analizada se encontró el alelo 15, que en grupos afroamericanos y caucásicos no se presenta, mientras que si lo hace en grupos árabes e hispanoamericanos (Tabla 15).

Tabla 15

Frecuencia alélicas en por ciento para el marcador D1S80 en diferentes poblaciones.

Alelo	<i>Noreste de México</i> N=103	Caucásicos US N=718	Hispanicos US N=409	Afroamericanos US N=606	Orientales N=204	Arabes N=300
15	0.971	-	0.1	-	-	0.33
16	3.883	0.1	1.0	0.2	3.4	0.83
17	0.485	0.2	0.9	2.8	2.5	1.33
18	23.301	23.7	22.4	7.3	15.2	21.17
19	3.398	0.3	0.5	0.3	2.2	0.67
20	0.971	1.8	1.3	3.2	0.7	1.17
21	2.427	2.1	2.8	11.5	3.4	2.33
22	1.456	3.8	2.4	8.1	1.7	4.67
23	1.942	1.2	0.9	1.4	1.7	2.17
24	20.388	37.8	31.5	23.4	23.0	42.33
25	7.767	4.6	7.2	4.5	2.7	2.67
26	2.427	2.0	0.7	0.6	-	3.00
27	-	0.7	1.6	0.8	4.7	1.50
28	7.282	6.3	7.8	13.0	7.6	4.17
29	5.340	5.2	5.5	5.3	4.2	6.17
30	7.282	0.8	3.9	0.9	12.3	0.83
31	7.767	7.2	5.3	5.4	9.3	2.17
32	0.971	0.6	0.5	0.7	1.2	0.50
33	-	0.3	0.4	0.4	0.5	-
34	0.971	0.1	0.6	8.6	0.5	1.33
35	-	0.3	-	0.2	0.5	-
36	0.485	0.4	1.1	0.1	0.5	0.17
37	-	0.1	0.4	-	0.7	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	0.3	0.4	0.3	0.5	0.50
40	-	-	-	-	-	-
41	0.485	-	0.2	0.2	0.7	-
>41		0.1	0.6	0.7	0.2	-
H	87.0	78.4	80.1	87.0	90.7	76.5
Het	49	81	86	106	76	71
Hom	4	8	9	9	8	8

H: heterocigosidad Het: genotipos heterocigotos Hom: genotipos homocigotos

4.4 Marcador genético HLADQA1

El gen HLADQA1 ha sido ampliamente caracterizado en diferentes poblaciones. Por ejemplo, el Departamento de Genética Humana de la compañía Cetus y Roche Biomedical Laboratories pusieron a prueba el estuche de tipificación aquí empleado, mostrando datos de frecuencias alélicas en diferentes poblaciones incluyendo grupos de hispanos en EUA y México, y de mestizos de la Ciudad de México, así como otros grupos representativos de cada grupo racial como los negros, caucásicos y asiáticos. Se analizaron alrededor de 1400 individuos con la metodología de PCR, sumada a la hibridación reversa con sondas oligo alelo específicas, lo que hizo posible el análisis en forma rápida y veraz (56).

Las frecuencias obtenidas en el presente trabajo coinciden mucho con las reportadas para individuos procedentes de la Cd. de México. También se encuentra algo de similitud con las frecuencias obtenidas individuos tomados al azar de diferentes partes de México. No obstante, las reportadas para hispanos de EUA presentan mayores diferencias, como la frecuencia elevada del alelo 1.2, que tiene una frecuencia de 20.2% en comparación con los valores de alrededor del 8 % en población mexicana. Cabe mencionar que el grupo de hispanos en EUA fué seleccionado solamente en base a los apellidos y no al lugar de procedencia. Es así que este grupo incluía mexicanos, cubanos, puertorriqueños y españoles; es decir un grupo muy heterogéneo. Mientras que el grupo de México comprendía individuos de diferentes partes de la república mexicana (Tabla 16).

Tabla 16.

Frecuencias alélicas en porciento para el marcador HLADQA1 en poblaciones hispanas

Alelo	Noreste ^a	México ^b	Cd México ^b	Hispanos ^b
1.1	8.73	8.0	9.0	11.6
1.2	10.19	5.6	9.0	20.2
1.3	4.85	1.2	4.0	3.8
2	13.59	5.0	8.0	7.5
3	24.27	43.5	29.5	23.6
4	38.35	36.7	40.5	33.2

^a Frecuencias alélicas obtenidas en este trabajo.

^b Frecuencias alélicas reportadas por Helmuth y cols (60).

4.5 Utilidad de los marcadores D1S80, Apo B y HLADQA1

La caracterización de los individuos que forman los diferentes grupos poblacionales puede realizarse a nivel del DNA, analizando las regiones altamente polimórficas localizadas en esta biomolécula de alta complejidad. Cada individuo con su propia identidad genética, es a su vez reflejo de las características genéticas del grupo poblacional al que pertenece.

Los diferentes grupos poblacionales pueden ser caracterizados mediante diferentes tipos de marcadores genéticos, desde proteínas hasta DNA. Hoy en día, la genotipificación basada en el DNA es de elección por la informatividad que se obtiene al trabajar marcadores altamente polimórficos.

Las pruebas de DNA representan la opción de elección y dentro del genoma humano se han identificado una gran diversidad de marcadores de naturaleza diferente. La identificación de un individuo se puede realizar

analizando diferentes regiones a la vez o analizando varias regiones independientemente.

En este trabajo se analizaron tres regiones diferentes en forma independiente, la región codificante altamente polimórfica HLADQA1 y dos marcadores de región no codificante del tipo VNTR, ApoB y D1S80. Los tres marcadores resultaron muy polimórficos en la muestra analizada y se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno. También los tres marcadores se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg en esta población., por lo que pueden ser utilizados en estudios genéticos (Tabla 17). Además, el banco de datos conformado permitirá aplicar fórmulas matemáticas importantes para cada caso en particular.

Tabla 17

Pruebas para determinar equilibrio de Hardy-Weinberg

Marcador	N	Exacta	Indice de Verosimilitud		Heterocigosidad			
		Pr	-2 ln L	Pr	obs	esp	X ²	Pr
D1S80	103	0.51	7.03	0.57	89	90.4	0.19	0.76
HLADQA1	103	0.54	6.90	0.49	83	78.2	1.24	0.24
Apo B	103	0.79	7.35	0.77	91	87.3	1.03	0.28

Todos los marcadores estan en equilibrio de Hardy-Weinberg para las tres pruebas utilizadas.
Pr= Probabilidad

Cada marcador por sí solo no es suficiente para establecer la identidad de una persona, ya que los valores de las pruebas estadísticas como son la Probabilidad de Coincidencia al Azar (PCA), el Poder de Discriminación (PD) y Poder de Exclusión (PE), son bajos si se derivan de uno solo de los marcadores. La utilidad de los tres marcadores para establecer paternidad y en casos forenses radica en su uso combinado.

Tabla 18.

Parámetros utilidad de los marcadores D1S80, Apo B y HLADQA1

Marcador	N	NAD	FAM	PD	h	PCA	PE (%)
D1S80	103	20	0.0500	0.967	0.87	$4.9 \cdot 10^{-3}$	75.40
HLADQA	103	6	0.1667	0.896	0.76	$5.1 \cdot 10^{-2}$	54.42
Apo B	103	16	0.0625	0.951	0.84	$7.6 \cdot 10^{-3}$	70.08
Conjunto	103					$1.9 \cdot 10^{-6}$	96.64

NAD = Número de alelos diferentes

FAM = Frecuencia Alélica Media

PD = Poder de Discriminación (Capacidad de distinguir entre 2 individuos)

h = Heterocigosidad

PCA = Probabilidad de Coincidencia al azar

PE = Probabilidad de Exclusión

Los valores máximos obtenidos para la combinación de los tres marcadores fueron: PCA= 1.9×10^{-6} y PE= 96.64% (Tabla 18). Estos valores son buenos, pero debido a las características propias de esta población, se requiere introducir un número mayor de marcadores para poder aumentar los valores estadísticos como son el PD, PE y PCA. .

Por lo anteriormente descrito, es necesario incrementar el número de marcadores genéticos, ya sean tipo VNTRs o marcadores tipo STRs, éstos últimos son aún más polimórficos, para así alcanzar los valores estadísticos recomendados para las pruebas de identificación de individuos.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- 1) Se implementó en el laboratorio la metodología para realizar el análisis de los marcadores genéticos : Apo B, D1S80 y HLADQA1.
- 2) Se formó un banco de DNA de personas sanas, no emparentadas entre sí que será útil para analizar diferentes marcadores genéticos en nuestra población y así establecer los de mayor utilidad para pruebas de identificación de individuos.
- 3) A cada muestra del banco se le estableció el genotipo para cada uno de los tres marcadores.
- 4) Se formó un banco de datos con la información alélica y genotípica obtenida de los individuos de esta muestra de la población mexicana, para los tres marcadores genéticos seleccionados.
- 5) Los marcadores Apo B, D1S80 y HLADQA1 se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg, por lo que pueden utilizarse en estudios genéticos.
- 6) El uso combinado de los marcadores HLADQA1, Apo B y D1S80 tiene un Poder de Exclusión del 96.64% y un Poder de Coincidencia al Azar de 1.9×10^{-6} .

- 7) El poder de exclusión obtenido (96.64 %) de la tipificación de los marcadores HLADQA1, Apo B y D1S80, hace necesario el análisis de un número mayor de marcadores para así incrementar los valores de PE en las pruebas de paternidad.

- 8) Para incrementar los valores de las pruebas que miden la probabilidad estadística de encontrar la diferencia o coincidencia al azar entre dos individuos, es necesario utilizar (además de Apo B, D1S80 y HLADQA1) un número mayor de marcadores genéticos polimórficos.

BIBLIOGRAFIA

1. Watson JD y Crick FHC (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171: 737-738.
2. Thompson MW, McInnes RR y Willard HF (1994). Genetics in Medicine 5th edition. WB Saunders Company.
3. Caskey T., Hammond H. DNA-based Identification: Disease and Criminals In: DNA Technology and Forensic Science. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
4. Armour JAL y Jeffreys AJ (1992). Biology and applications of human minisatellite loci. *Current Opinion in Genetics and Development* 2: 850-856.
5. Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
6. Wyman AR, White R (1980) A Highly Polymorphic Locus in Human DNA. *Proc. Natl Acad Sci USA* 77: 6754-6758.
7. Bell GL, Selby MJ, Rutter WJ (1982). The Highly Polymorphic Region Near the Human Insulin Gene is Composed of Simple Tandemly Repeating Sequences. *Nature* 295: 31-35.
8. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV (1983). Complete Nucleotide Sequence of the T24 Human Bladder Carcinoma Oncogene and its Normal Homologue. *Nature* 302: 33-37.
9. Higgs DR, Goodbourn SEY, Wainscoat JS, Clegg JB, Weatherall DJ (1981). Highly Variable Regions of DNA Flank the Human Globin Genes. *Nucleic Acids Res* 9-. 4213-4224.
10. Jeffreys AJ, Wilson V, Zilla W, Patel I, Royle N y Clarksan R. Highly Variable Minisatellite and DNA Fingerprints. *Biochem Soc Symp* 53: 165-180.
11. Armour JAL Jeffreys AJ (1992) Recent advances in minisatellite biology. *FEBS* 307: 113-115

12. Litt M y Luty JA (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J hum Genet* 44: 397-401.
13. Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n X (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
14. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49: 746-756.
15. Fregeau C. J. and Fourney R. M. DNA Typing with Fluorescently Tagged Short Tandem Repeats: A sensitive and Accurate Approach to Human Identification. (1993) *BioTechniques* 15: 100-119.
16. Schumm JW (1996). New Approaches to DNA Fingerprint Analysis. *Promega Notes* 58: 12-20.
17. Kipton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES y Adams M (1993). Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 3: 13-22.
18. Kimpton CP, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J y Gill P (1994). Evaluation of and automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci.
19. Urquhart A, Oldroyd NJ, Kimpton CP y Gill P (1995). Highly Discriminating Heptaplex Short Tandem Repeat PCR System for Forensic Identification. *BioTechniques* 18: 116-121.
20. Jeffreys AJ, Wong Z, Wilson V, Patel I, Neumann R, Royle N and Armour JAL. (1989) Applications of Multilocus and Single-locus Minisatellite DNA Probes in Forensic Medicine. *DNA Technology and Forensic Science*.
21. Jeffreys AJ (1991). Advances in Forensic Science: Applications & Implications of DNA Testing. *Science in Parliament* 48(1): 2-7.
22. Vogelstein B., Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. (1989). Allelotype of Colorectal Carcinomas. *Science* 244: 207-211.
23. Malcolm S, Cllayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JAL, Jeffreys AJ, Pembrey ME (1991) Uniparental Paternal Isodisomy in Angelman's Syndrome. *Lancet* 337: 694-697.

24. Wong Z, Wilson V., Patel I, Povey S, Jeffreys AJ, (1987) Characterization of a Panel of Highly Variable Minisatellites Cloned from Human DNA. *Ann Hum Genet* 51: 269-288.
25. Mullis KB y Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
26. Knott TJ, Wallis SC, Pease RJ, Powell LM y Scott J (1986). A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene. *Nucleic Acids Research* 14(22): 9215-9216.
27. Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC, Innerarity TL, Blackhart B, Taylor WH, Marcel Y, Milne R, Johnson D, Fuller M, Lusic AJ, Mc Carthy BJ, Mahley RW, Levy-Wilson B y Scott J (1986). Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature* 323: 734-738.
28. Lehninger AL, Nelson DL y Cox MM. (1993) Principles of Biochemistry. 2nd ED. Worth Publishers, Inc.
29. Hegele RA, Huang L-S, Herbert PN, Blum CB, Buring JE, Hennekens CH y Breslow JL (1986). Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. *N Engl J Med* 315: 1509-1515.
products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *BioTechniques* 7: 736-744.
30. Huang L-S y Breslow JL (1987). A Unique AT- rich Hypervariable Minisatellite 3' to the ApoB Gene Defines a High Information Restriction Fragment Length Polymorphism. *The Journal of Biological Chemistry* 262(19): 8952-8955.
31. Nakamura Y, Carlson M, Krapcho K y White R (1988). Isolation and Mapping of a Polymorphic DNA Sequence (pMCT118) on Chromosome 1p (D1S80). *Nucleic Acids Research* 16: 9364.
32. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E y White R (1987). Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 235:1616-1622.
33. Kloosterman AD, Budowle B, and Daselaar P. (1993) PCR-Amplification and Detection of the Human D1S80 VNTR Locus: Amplification Conditions, Population Genetics, and Application in Forensic Analysis. *International Journal of Legal Medicine* 105: 257-264.
34. Kasai K, Nakamura Y y White R (1990). Amplification of a Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Locus (pMCT118) by the Polymerase Chain

Reaction (PCR) and Its Application to Forensic Science. *Journal of Forensic Sciences* 35(5):1196-1200.

35. Allen R, Budowle B, Chakraborty R, Giusti A and Eisenberg A. 1991. Analysis of the VNTR Locus AmpliFLP D1S80 by the PCR Followed by High-Resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics* 48: 137-144.
36. Allen RC, Graves G, Budowle B 1989. Polymerase chain reaction amplification
37. Schnee-Griese J y Teifel-Greding J (1991). DNA Length Polymorphism of the ApoB 3' Region: Frequency Distribution of the Alleles in the German Population. *Forensic Science International* 51: 173-178.
38. Cosso S y Reynolds R (1995). Validation of the AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification Kit for Forensic Casework Analysis According to TWGDAM Guidelines. *Journal of Forensic Sciences* 40(3):424-434.
39. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT and Dimhofer R. (1991) Typing of Deoxynuclei Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains. *Journal of Forensic Sciences* 36; 1649-1661.
40. Trowsdale J, Young JAT, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H y So A (1985). Structure, sequence and polymorphism in the HLAD region. *Immunol Rev* 85: 5-43.
41. Rivas F, Zhong Y, Olivares N, Cerda-Flores RM y Chakraborty R (1997). Worldwide Genetic Diversity at the HLA-DQA1 Locus. *American Journal of Human Biology* 9: 735-749.
42. Kostyu DD, Ammos DB. The HLA Complex: Genetic Polymorphism and Disease Susceptibility En Scriver C, Beaudet AL, Sly W, Valle B editores. *The Metabolic bases of Inherited disease* 6th edition.
43. Nepom GT y Erlich H (1991). MHC Class II Molecules and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 9: 493-525.
44. Erlich HA y Bugawan T (1989). HLA class II gene polymorphism: DNA typing, evolution, and relationship to disease susceptibility. En: H Erlich (ed) *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. Stockton, New York.
45. Thompson G (1981). A review of theoretical aspects of HLA and disease associations. *Theor. Pop. Biol* 20: 168-208.
46. Wordsworth P (1991). PCR-SSO Typing in HLA-Disease Association Studies *European Journal of Immunogenetics* 18: 139-146.

47. Maeda M, Murayama N, Ishii H, Uryu N, Ota M, Tsuji K e Inoko H (1989). A simple and rapid method for HLADQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allelic specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* 34: 290-298.
48. Perkin Elmer (1995). AmpliType HLADQ α PCR Amplification and Typing Kit Protocol.
49. Saiki RW, Walsh PS, Levenson CH y Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence specific oligo nucleotide probes *Proc Natl acad Sci USA* 86: 6230-6234.
50. Comey CT y Budowle B (1991). Validation studies on the analysis of the HLA-DQ α locus using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences* 36(6): 1633-1648.
51. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.
52. Boerwinkle E, Xiong W, Fourest E y Chan L (1989). Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 212-216.
53. März W, Ruzicka V, Fisher E, Russ AP, Schneider W y GroB W (1993). Typing of the 3' hypervariable region of the apolipoprotein B gene: Approaches, pitfalls, and applications. *Electrophoresis* 14: 169-173.
54. Huang L-S y Breslow JL (1987). A Unique AT- rich Hypervariable Minisatellite 3' to the ApoB Gene Defines a High Information Restriction Fragment Length Polymorphism. *The Journal of Biological Chemistry* 262(19): 8952-8955.
55. Santamaria P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL, Barbosa JJ, Faras AJ y Rich SS (1992). HLA Class II "Typing": Direct Sequencing of DRB, DQB and DQA Genes. *Human Immunology* 33: 69-81.
56. Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W, Higuchi R y Erlich H (1990). HLA-DQ α Allele and Genotype Frequencies in Various Human Populations, Determined by Using Enzymatic Amplification and Oligonucleotide Probes. *American Journal of Human Genetics* 47: 515-523.
57. Chakraborty R (1992). Sample size requeriments for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Human Biology* 64: 141-159.

58. Chakraborty R, Zhong Y (1994). Statistical power of an exact test of Hardy-Weinberg proportions of genotypic data at multiallelic locus. *Human Heredity* 44: 1-9.
- 58^a. Li CC (1976). *First Course in Population Genetics*. Pacific Grove, CA. Boxwood Press.
59. Weir BS (1991) *Genetic Data Analysis*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
60. Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372
61. Chakraborty R, Fornaze M, Guegue R, Boerwinkle E (1991) Populations genetics of hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a populations. En : Burke T, Dolf G, Jeffreys AJ, Wolff R (editores). DNA fingerprinting: approaches and applications. Birkhäuser, Basel, 127-143.
62. Deka R, Chakraborty R, Ferrel RE (1991) A population genetic study of six VNTR loci in three ethnically defined populations. *Genomics* 11: 83-92.
63. Edwards A, Hammond H, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R (1992) Genetic variation of five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four population groups. *Genomics* 12: 241-253.
64. Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W, Higuchi R y Erlich H (1990). HLA-DQ α Allele and Genotype Frequencies in Various Human Populations, Determined by Using Enzymatic Amplification and Oligonucleotide Probes. *American Journal of Human Genetics* 47: 515-523.
65. Wong Z, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys AJ (1987). Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet.* 269-88.
66. Deka R, Chakraborty R, DeCruo S, Rothhammer F, Barton SA y Ferrell RE (1992). Characteristics of Polymorphism at a VNTR Locus 3' to the Apolipoprotein B Gene in Five Human Populations. *American Journal of Human Genetics* 51: 1325-1333.
67. Renges H-H, Peacock R, Dunning AM, Talmud P, Humphries SE, (1992) Genetic relationship between the 3' VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphism: haplotype analysis in individuals of European and South Asian origin. *Ann Hum Genet* 56: 11-33.
68. Hixson JE, Powers PC y MacMahan MC (1993). The human apolipoprotein B 3' hypervariable region: detection of eight new alleles and comparisons of allele frequencies in blacks and whites. *Hum Genet* 91: 475-479.

69. Destro-Bisol G, Presciuttini S, dAloja E, Dobosz M, Spedini G y Pascalli VL (1994). Genetic Variation at the ApoB3' HVR, D2S44, and D7S21 Loci in the Ewondo Ethnic Group of Cameroon. *American Journal of Human Genetics* 55: 168-174.
70. Lamropoulos AF, Frangoulides E, Kotsis A y Dozi-Vassiliades Y (1995). Rapid typing of 4 VNTR Loci, 3'ApoB, MCT118, St14 and YNZ22 by the Polymerase Chain Reaction of a Greek sample. *Cellular and Molecular Biology* 41(5): 699-702.
71. Ludwing EH, Friedl W y McCarthy BJ (1989). High-Resolution Analysis of a Hypervariable Region in the Human Apolipoprotein B Gene. *American Journal of Human Genetics* 45: 458-464.
72. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ y Allen RC (1991). Analysis of the VNTR Locus D1S80 by the PCR Followed by High-Resolution PAGE. *American Journal of Human Genetics* 48: 137-144.
73. Budowle B, Baechtel S, Smerick JB, Presley KW, Giusti AM, Parsons G, Alevy MC y Chakraborty R (1995). D1S80 Population Data in African Americans, Caucasians, Southeastern Hispanics, Southwestern Hispanics, and Orientals. *Journal of Forensic Sciences* 40(1): 38-44.

APENDICE

Preparación de reactivos

En algunos casos las soluciones deben ser esterilizadas en una autoclave a 15 lb/in² durante 15 min.

Las condiciones de almacenamiento, si no se especifica otra cosa, es a temperatura ambiente.

Agarosa 0.8%, 2%

Pesar 0.8 g, 2 g de agarosa, respectivamente, agregar 100 ml de TBE 1X y fundir.

Bromuro de Etidio 10 mg/ml

Disolver una pastilla de 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua ultrapura. A partir de esta solución se prepara una solución de trabajo de 0.3 µg/µl.

Buffer de Citratos (Citrato de sodio 0.1 M pH 5.0)

Disolver 7.36 g de citrato trisódico dihidratado en 300 ml de agua ultrapura. Ajustar el pH a 5 adicionando 2.4 g ácido cítrico anhidro. Ajustar el volumen a 400 ml con agua ultrapura y mezclar perfectamente. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de lisis TSNT (SDS 1 %, Tritón 2 %, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM)

A 28 ml de agua ultrapura y autoclaveada agregar 2 ml de tritón X100 y 10 ml de SDS 10%, mezclar hasta que la solución quede incolora. Por separado, a 40 ml de agua ultrapura y autoclaveada agregar y disolver 0.584 g de NaCl, 0.0372 g de EDTA y 0.5 ml de Tris-HCl 2 M pH 8 y aforar 60 ml. Mezclar la solución de detergentes con la solución de sales.

Buffer SSPE 20X (NaCl 3.6 M, NaH₂PO₄•2 H₂O 200 mM, EDTA 20 mM, pH 7.4)

Disuelva 7.4 g de Na₂EDTA•2H₂O en 800 ml de agua ultrapura. Ajuste el pH a 6.0 (± 0.2) con 10 N NaOH. Agregue 210 g de NaCl y 27.6 g de NaH₂PO₄•H₂O. Ajuste el pH a 7.4 (± 0.2) con NaOH 10 N. Afore a un volumen final de 1 L y mezcle bien. Esterilizar.

EDTA 0.5 M, pH= 8.0

Agregar 186.1 g de Na₂EDTA.2H₂O a 800 ml de H₂O destilada, mezclar vigorosamente con un agitador magnético hasta disolver. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH en pastillas y aforar a 1 L Esterilizar

Fenol saturado.

Fundir el fenol, en caso de que su aspecto no sea cristalino, se debe de destilar.

Saturación: antes de usar el fenol debe de ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido. Agregar 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%. Añadir un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8, agitar durante 24 hrs en el cuarto frío. Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o bien en un embudo de separación. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1M pH 8, conteniendo 0.2 % de β- mercaptoetanol. Repartir en alícuotas y almacenar a -20°C en frasco oscuro. Las soluciones amortiguadoras que se utilizan para la saturación se preparan con agua ultrapura y se esterilizan.

C:AI (Cloroformo:Alcohol Isoamílico) 24:1

Agregar 1 ml de alcohol isoamílico a 24 ml de cloroformo.

Jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 ml de glicerol en agua ultrapura estéril, aforar a 10 ml.

Peróxido de Hidrógeno 3%

Agregar 100 μL de H_2O_2 al 30% a 900 μL de agua ultrapura y mezcle perfectamente. Proteja de la luz y almacene de 2° a 8°C. El peróxido de hidrógeno puede almacenarse por espacio de 6 meses. Puede utilizarse alternativamente un décimo del volumen de H_2O_2 al 30% directamente en el paso de desarrollo de color.

Persulfato de Amonio 10 % p/v

Agregar 1 g de persulfato de amonio a 10 ml de agua ultrapura. Guardar la solución a 4°C protegida de la luz.

SDS 10% (p/v)

Agregue y disuelva lentamente 10 g de SDS en 100 ml de agua ultrapura autoclaveada. Puede calentar a 37°C para disolver totalmente los sólidos presentes.

Solución de Hibridación (SSPE 5X, SDS 0.5% p/v)

Mezclar 250 ml de SSPE 20 X y 50 ml de SDS 10% p/v y 700 ml de agua ultrapura. Para disolver todos los sólidos presentes se debe calentar la solución en un baño de agua a 37-55°C.

Solución de desarrollo de color

Mezclar suavemente y en el orden siguiente 10 ml de buffer de citratos, 10 μl de H_2O_2 y 0.5 ml del cromógeno (3'3'5'5'tetrametilbenzidina). No vortexear. No prepararla más de 10 minutos antes de usarla.

Solución de Lavado (SSPE 2.5 X, SDS 0.1 % p/v)

Mezclar perfectamente 250 ml de SSPE 20X, 1,730 ml de agua ultrapura y 20 ml de SDS 10% p/v. Para disolver todos los sólidos presentes se debe calentar la solución en un baño de agua a 37-55°C.

TE 100X (1 M Tris-HCl, 1M, EDTA 100 mM)

Mezclar 25 ml de Tris-HCl 2M pH 8 con 10 ml de EDTA 0.5 M pH 8 aforar a 50 ml con agua ultrapura y esterilizar. A partir de este stock se prepara una solución de trabajo al 1 X.

TBE 10 X, pH 8 (Tris-borato 0.9 M, EDTA 0.02 M)

Agregar en forma alternada 108 g de trizma base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8 a 800 ml de agua ultrapura. Mezclar hasta disolver por completo los reactivos. Aforar a 1 y esterilizar. A partir de éste stock se prepara una solución de trabajo al 1X.

TBE 20 X, pH 9 (Tris 0.18 M, 1.8 M Acido Bórico, EDTA 40 mM)

Agregar en forma alternada 21.8 g de trizma base, 111.3 g de ácido bórico y 80 ml de EDTA 0.5 M pH 9 a 800 ml de agua ultrapura. Mezclar hasta disolver por completo los reactivos. Aforar a 1 y esterilizar. A partir de éste se prepara una solución de trabajo al 1X.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ma. del Carmen Villalobos Torres

Candidato para el Grado de

**Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética**

**Tesis: FRECUENCIAS ALELICAS DE TRES MARCADORES GENETICOS
POLIMORFICOS EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION DEL
NORESTE DE MEXICO.**

Campo de Estudio: Genética Molecular de Poblaciones

**Biografía: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 26 de Noviembre de 1966, hija de
Reynaldo G. Villalobos Barrera y Consuelo Torres Esqueda.**

**Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Químico Clínico Biólogo en 1988, tercer lugar de generación.**

**Experiencia profesional: Asistente de investigación en el Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. desde Febrero de 1989.**



