



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**FRECUENCIA DEL GEN AMELY NULO EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN
VENEZOLANA.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad
Central Venezuela, por la bachiller
Michelle Paola Garcia Reyes como
requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutores: Msc. Joseba Celaya Linaza

Dra. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela

Noviembre, 2014

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL JURADO

DEDICATORIA

A DIOS todo poderoso

Quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis Padres

Quienes me han apoyado incondicionalmente, para poder llegar a esta instancia de mis estudios y me han brindado lo mejor de si, para velar porque tenga una vida plena, feliz y llena de éxitos.

A mi ángel “Mi Gallego”

Quien sé que desde el cielo me ha guiado e iluminado mi camino y sé que está celebrando mis triunfos y feliz porque soy feliz, orgulloso porque cada día estoy más cerca de ser la mujer que él dejó tanto amor, sabiduría y formación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular de la Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Medicina “Luis Razetti”, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela UCV. Fue financiado por CDCH-UCV, Proyecto PI-09-8062-2011 y ayudas de la Coordinación de Investigación de la escuela de Medicina.

Agradecimientos:

Agradecemos al Dr. Pedro Michelli, jefe de la Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, UCV, por acoger la realización de este proyecto en el laboratorio bajo su dirección.

Agradecemos al Dr. Álvaro Rodríguez Del Laboratorio de Genética Humana del Centro de Medicina experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, por revisar y corregir el anteproyecto. Igualmente queremos agradecer a la Dra. Dinorah Castro, Dra. Irene Paradisi, Lic.Cristina Figuera, MSc. Gilberto Gómez y a todo el personal del Laboratorio de Genética Humana sus consejos técnicos e invaluable ayuda para mejorar las técnicas de PCR y Electroforesis en los casos más difíciles.

Agradecemos a la Dra. Fátima Garcés del Laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Cátedra de “Bioquímica A” por su colaboración.

Agradecemos al personal de los Bancos de Sangre del Hospital Universitario de Caracas y del Hospital Simón Bolívar de los Valles del Tuy por todas las muestras de sangre aportadas.

Agradecemos al Msc. Rafael Aguilar por la guía y el apoyo durante la realización del seminario I. Agradecemos a Dra. Guillermina Alonso por su apoyo y asesoría en la realización y presentación del trabajo y a la Dra. Roxana Gajardo y Dra. Maitte Hernández por su apoyo y evaluación como jurados del trabajo especial de grado.

RESUMEN

El gen AMEL tiene dos copias, una en el cromosoma X conocida como AMELX, su locus Xp21,1-Xp21,3 tiene 2.872 pares de bases de longitud y otra en el cromosoma Y, AMELY, mapea en Yp11,2 tiene 3.272 pb de longitud, ambas copias son genes funcionales, que codifican la proteína amelogenina la cual forma parte del esmalte dental. El gen consta de 7 exones y 6 intrones y es un marcador genético de sexo. Generalmente se utilizan los oligómeros diseñados por Sullivan cuyas secuencias blanco flanquean una delección de 6 pb en AMELX (intron 1). Los amplicones generados por AMELX (106 pb) y AMELY (112 pb) se resuelven por electroforesis identificando el sexo del donante de la muestra. Los kits comerciales de identificación utilizan estos oligómeros en su diseño original o con modificaciones menores. En hembras con cariotipo XX, el sistema de electroforesis que se utilice (geles de acrilamida planos o capilares) mostrará una sola banda o un solo pico, mientras que en varones (XY) mostrará dos bandas o dos picos muy cercanos.

Puede ocurrir un alelo AMELX nulo (no amplifica) pero el resultado seguirá siendo un femenino correcto o un masculino con una sola banda Y (112 pb), pero un alelo AMELY nulo será interpretado como falso femenino. En este trabajo buscamos alelos nulos en Y, en una muestra de población masculina venezolana (332 individuos no relacionados) para estimar su frecuencia y calcular el error típico. Se hallaron 5 posibles falsos femeninos que posteriormente se demostró que no eran masculinos, mediante el uso de pruebas alternativas que demuestran la presencia o ausencia del cromosoma masculino Y. Estimamos que la frecuencia de AMELY nulo en población venezolana, si existieran, es tan baja que no encontramos uno, forzosamente menor que 0,003 (Tres de cada mil).

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL JURADO.....	II
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	25
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXOS.....	69

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de ligamiento del cromosoma X.....	10
Figura 2. Mapa de ligamiento del cromosoma Y.....	11
Figura 3. Organización estructural del gen AMEL humano y bovino.....	12
Figura 4. Cariotipo normal humano.....	13
Figura 5. Representación esquemática de las regiones de homología y deleciones entre AMELX y AMELY.....	15
Figura 6. Marcadores genéticos del CODIS.....	16
Figura 7. Secuencia del gen AMEL, comparación de las copias en los cromosoma X y Y.....	17
Figura 8. Electroferograma.....	23
Figura 9. Electroferograma típico.....	27
Figura 10. Gel de acrilamida 6%.....	30
Figura 11. Gel de poliacrilamida al 8%.....	31
Figura 12. Componentes en sangre separados por densidad.....	35
Figura 13. Precipitación del.....	37
Figura 14. Sitios de alineamiento de los oligómeros propuestos por Sullivan.....	39
Figura 15. Corrida rápida en gel de agarosa 1%.....	44
Figura 16. Geles de acrilamida 10%.....	45
Figura 17. Gel Acrilamida15%.....	47
Figura 18. Gel de acrilamida 15%.....	48
Figura 19. Gel de acrilamida 10%.....	49
Figura 20. Gel de acrilamida10%.....	50
Figura 21. Corrida rápida en gel acrilamida 8%.....	52
Figura 22. Gel acrilamida 8%.....	53
Figura 23. Ampliación de la región de interés de la figura 22.....	53
Figura 24. Estandarización de la prueba DYZ3. Gel acrilamida 12%.....	54
Figura 25. Gel acrilamida 12%.....	55
Figura 26. Gráfico de barras del número de individuos estudiad.....	57
Figura 27. Gráfico que ilustra las poblaciones que conforman el aporte genético de la poblacion mestiza venezolana.....	59

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Tipos de homología entre genes.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 2. Distribución de la frecuencia de AMELY nulos en diferentes poblaciones.....</i>	<i>28,29</i>
<i>Tabla 3. Secuencia de los oligómeros S1 y S2</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 4. Secuencia de los oligómeros S3 y S4</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 5. Condiciones para PCR con oligómeros S1 y S2.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 6. Condiciones para PCR con oligómeros S3 y S4.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 7. Secuencia de los oligómeros Y1 y Y2.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 8. Condiciones para PCR con oligómeros Y1 y Y2.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 9. Estimación de mezcla de la población venezolana.....</i>	<i>60</i>

ABREVIATURAS

AMELX	Gen AMEL ubicado en el cromosoma X
AMELY	Gen AMEL ubicado en el cromosoma Y
Kit	Conjunto de piezas, instrumentos o reactivos.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
MgCl₂	Cloruro de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
TAE	Tris HCl ácido acético EDTA
µL	Microlitros
mL	Mililitros
µM	Micromolar
M	Molar
pmol	Picomoles
mm	Milímetros
min	Minutos
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
NLB	Nuclear Lysis Buffer
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
STR	Short Tandem Repeat

INTRODUCCIÓN

El gen **AMEL**, es un gen funcional que codifica una proteína, la cual está presente en mayor concentración en el esmalte dental durante el desarrollo (Eastoe, 1965).

Este gen fue ubicado en los cromosomas sexuales en humanos y ratón por Lau y colaboradores en 1.989. Los autores reportaron una sola copia del gen en ratón ubicado en el cromosoma X y dos copias en humanos, una en el cromosoma X y otra en Y, situadas en la parte distal del brazo corto de X (Xp22,1-Xp22,3), figura 1, y en la región pericentromérica del brazo corto de Y (Yp), figura 2, pero no alcanzaron a secuenciar el gen. Como se halló que en muchos animales el gen está en copia única localizada en el cromosoma X, los autores asumieron que la copia en Y es evolutivamente derivada de la primera (Lau, 1989).

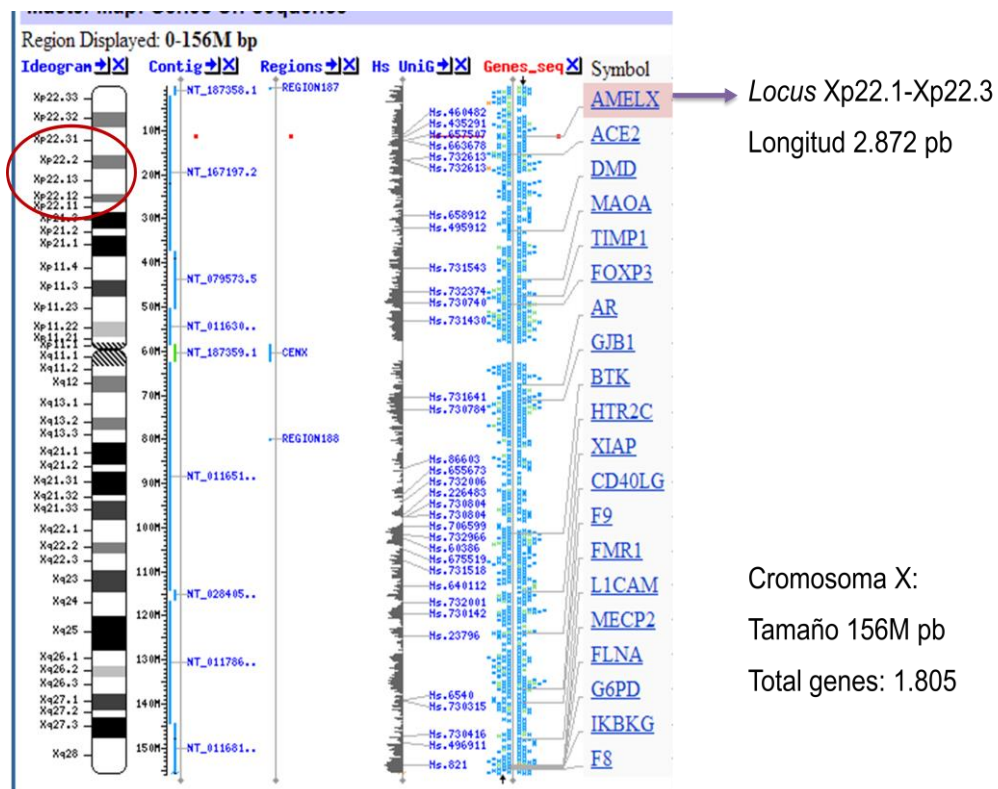


Figura 1. Mapa de ligamiento del cromosoma X, en la figurase muestra resaltado en el ovalo rojo el locus del gen AMELX. En la nomenclatura moderna de los genes humanos la copia del gen situada en el cromosoma X se la conoce como AMELX, cuyo locus es Xp22,1-Xp22,3 y tiene 2.872 pares de bases de longitud.(Imagen tomada de www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)

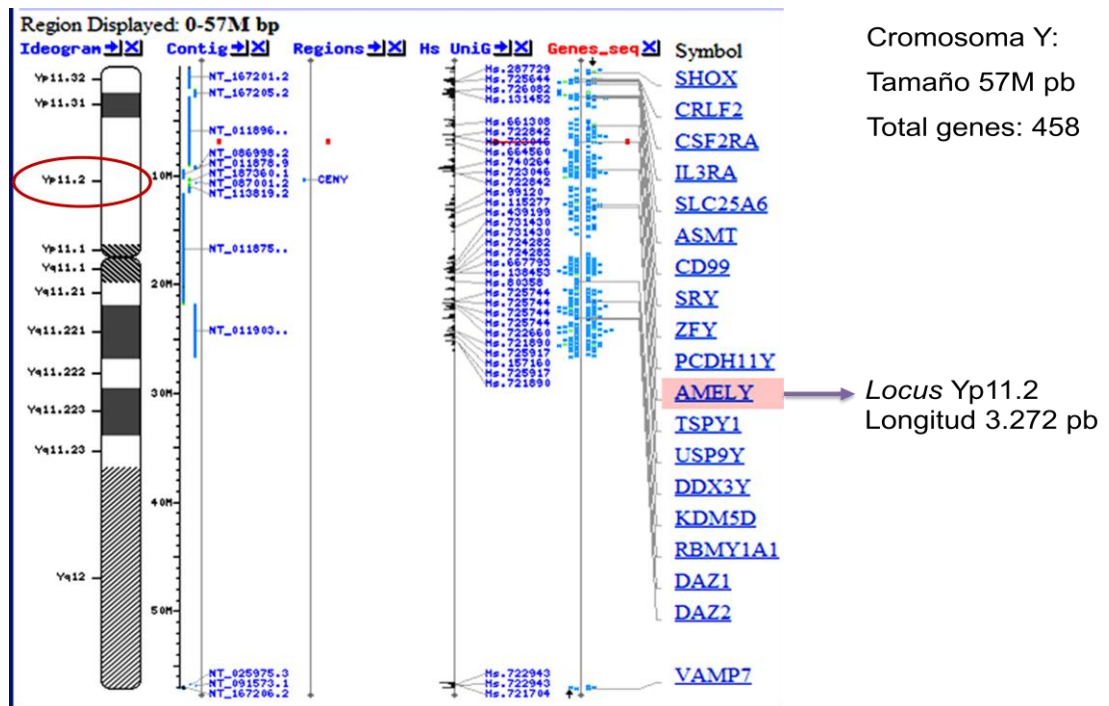


Figura 2. Mapa de ligamiento del cromosoma Y, en la figura se muestra resaltado con el ovalo rojo el locus del gen AMELY. La copia del gen AMEL en Y se la conoce como AMELY, locus Yp11,2 y tiene 3.272 pb de longitud (Imagen tomada de www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/)

El gen AMEL bovino fue aislado, clonado y secuenciado parcialmente por Shimokawa en 1987, como se muestra en la figura 3, el gen AMEL humano, presente en los cromosomas X y Y, está formado por 7 exones y ambas copias codifican una proteína, la amelogenina.

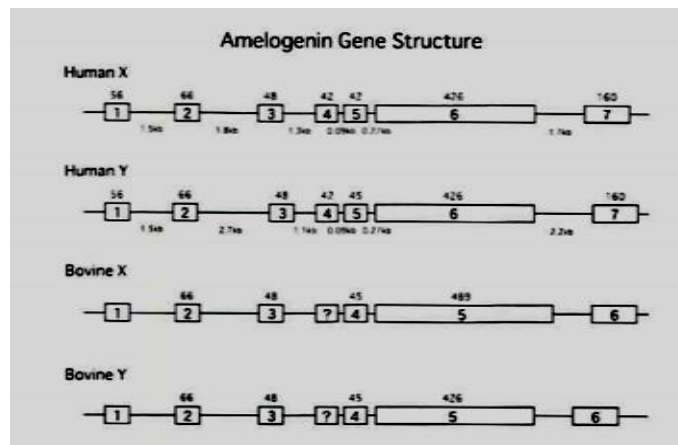


Figura 3. Organización estructural del gen AMEL humano y bovino, en la imagen os exones se encuentran enumerados 1 al 7 para el gen en humanos y de 1 al 6 en bovino. Los números sobre los exones indican la longitud de éstos en pares de bases (pb). Los números debajo de las líneas indican la longitud de los intrones en el gen humano. Un exón en el gen de bovino señalado con un signo de interrogación (?), corresponde al exón 4 del gen humano que en esa época no había sido identificada (Imagen tomada de Shimokawa, 1987).

Por lo tanto en humano existen dos genes que codifican esta proteína, uno localizado en el cromosoma X denominado AMELX y otro ubicado en el cromosoma Y llamado AMELY (Salvador, 2008).

La amelogenina ha sido secuenciada totalmente en su composición de aminoácidos por Fichmany colaboradores en 1991, analizaron por electroforesis extractos de la proteína y encontraron que existía una diferencia en los componentes de ésta dependiendo del sexo del individuo de donde se tomaba la muestra.

Evolución del gen AMEL

Se piensa que, los cromosomas sexuales se originaron a partir de un par de cromosomas autosómicos ancestrales que cesaron de recombinar hace 300M de años, acumulando diferencias entre ellos, dando origen a los cromosomas Sexuales X y Y como los conocemos hoy día, como se

evidencia en la figura 4 (Graves, 2002), lo que explica la existencia de genes homólogos en los cromosomas sexuales.



Figura 4. Cariotipo normal humano, en la imagen se muestra los cromosomas de un individuo masculino, ordenados por su tamaño, de mayor a menor. Cromosomas autosómicos (1 al 22) y la pareja de cromosomas sexuales X y Y.

La homología es una relación entre los rasgos debida a una ascendencia, un origen común. (Ver tabla 1)

Tabla 1. Tipos de homología entre genes

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

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

Aplicación del gen AMEL de humano como marcador genético de sexo:

Las diferencias detectadas en las secuencias de las dos copias del gen (AMELX y AMELY), se aprovecharon para desarrollar un marcador genético de sexo sencillo de un solo paso por PCR (Nakahori, 199; Akane, 1992; Sullivan, 1993) y desde entonces ha mejorado mucho el conocimiento de las características del gen, el análisis simultáneo de estos dos genes es de gran utilidad en la identificación del sexo.

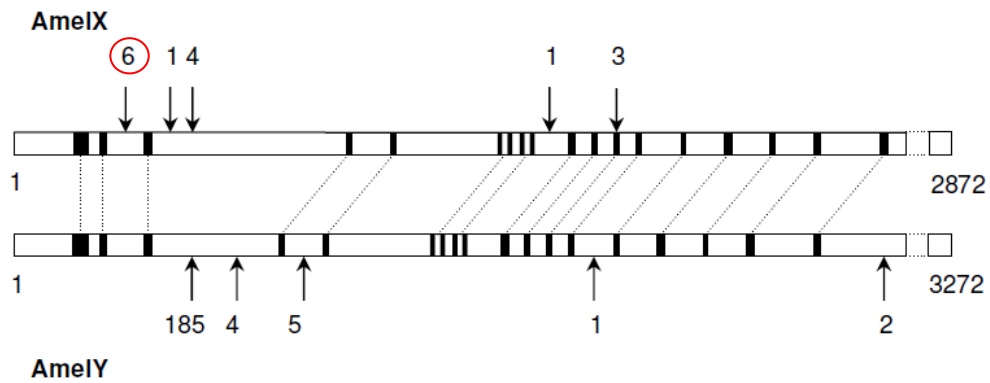
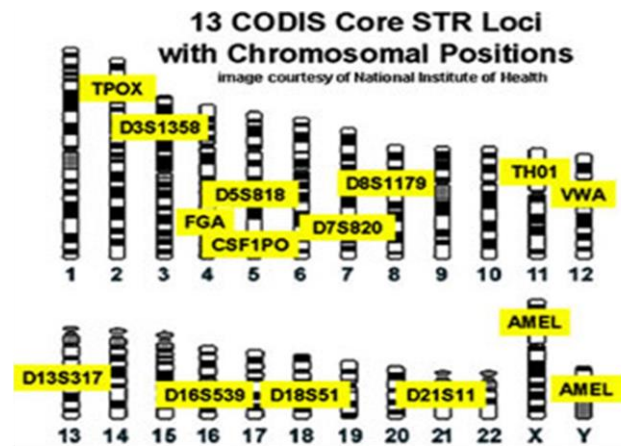


Figura 5. Representación esquemática de las regiones de homología y deleciones entre AMELX y AMELY. Las cajas en negro indican las regiones de homología absoluta. Las deleciones están señaladas por flechas, donde las que se encuentran encima de señalan las deleciones presentes en AMELX y las flechas que se encuentran por debajo indican las deleciones presentes en AMELY. Los números en las flechas corresponden a la longitud en pb de la deleciones indicadas en cada gen, el círculo rojo indica una deleción de 6pb presente en AMELX.

La deleción de 6 pb señalada con una circunferencia roja, en la figura 5, se encuentra ubicada en el intrón 1 de AMELX y es la deleción que flanquean los oligómeros de Sullivan, que son los utilizados principalmente en este proyecto para la identificación de sexo.

Los laboratorios especializados en pruebas de identificación genética forense, utilizan universalmente, *Kits* comerciales con marcadores autosómicos tipo STR, (por su acrónimo en inglés de *Short Tandem Repeat*), secuencias repetidas en tándem, híper variables y con herencia mendeliana, adicionalmente se utiliza un marcador de los cromosomas sexuales (AMEL) para la identificación de género, son sistemas de PCR Multiplex, figura 6.



Combined DNA IndexSystem (CODIS)

Figura 6. Marcadores genéticos del CODIS, se muestran 13 loci, propuestos por el FBI (Federal Bureau of Investigation), que se utilizan en kits multiplex comerciales, de identificación genética, entre ellos se encuentra como marcador de los cromosomas sexuales AMELX y AMELY. (Imagen tomado de <http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis>).

Usualmente los resultados de la PCR resuelven mediante, sistemas de electroforesis en capilar, utilizando secuenciadores y los resultados de la prueba son revelados en electroferograma.

El gen AMEL se usa como marcador de sexo, solo o en compañía en un Kit Multiplex de marcadores tipo STR.

Generalmente se utiliza el par de oligómeros diseñados por Sullivan, como prueba para la identificación del sexo (Sullivan, 1993), cuyas secuencias blanco flanquean una delección de 6 pb que ocurre en AMELX, se muestra la figura 6 y 7, por lo que los amplicones generados por AMELX (106 pb) y AMELY (112 pb) pueden ser resueltos por electroforesis permitiendo identificar el sexo del donante de la muestra.

Como las hembras poseen dos cromosomas X (cariotipo XX) el sistema de electroforesis que se utilice (geles de acrilamida planos o capilares) mostrará una banda o un sólo pico, mientras que en varones mostrará dos bandas o dos picos muy cercanos.



Figura 7. Secuencia del gen AMEL, comparación de las copias en los cromosoma X y Y. La zona resaltada con verde, señala la delección de 6 pb que existe en AMELX. Las flechas azules indican el sitio de hibridación del primer par de oligómeros de Sullivan que generan amplicones de 106 pb (X) y 112 pb (Y). Las flechas rojas indican el sitio de hibridación de un segundo par de oligómeros propuestos por Sullivan para identificación de sexo, que generan amplicones de 212 pb (X) y 218 pb (Y). (Tomado de Short Tandem Repeat DNA Internet Data Base, <http://www.cstl.nist.gov/strbase/index.htm>).

La gran mayoría de los kits comerciales de identificación genética utilizan los oligómeros de Sullivan, en su diseño original o con modificaciones menores, como se muestra en la figura 7.

Errores que pueden ocurrir en este sistema:

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

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

La ausencia de un alelo X-específico es un caso raro pero que puede ocurrir. Igualmente es raro, pero puede ocurrir que mutaciones en las secuencias blanco de los oligómeros que se estén utilizando, los inhabilite de amplificar su región objetivo en AMELY (Santos, 1998; Roffey, 2000; Thangaraj, 2002; Chang, 2003; Shadrach, 2004; Lattanzi, 2005; Kashyap, 2006; Mark, 2007; Frances, 2008; Xueling, 2012), lo cual puede acarrear grave consecuencias en una investigación criminal, ya que en el caso de una muestra que sea masculino con AMELY nulo,

amplificará solo X y la identificación será incorrecta, arrojando un “**Falso Femenino**”.

Para el caso en el que se sospeche un AMELY, nulo existen una serie de pruebas alternativas, que pueden ayudar a dilucidar si la identificación del sexo fue correcta o incorrecta.

1. Cambiando el diseño de los oligómeros utilizados en la identificación, generando un amplicón más grande, alejando las zonas blanco de los sitios mutados (X212 y Y218 pb de Sullivan), (Mark, 2007; Frances, 2008).
2. Utilizando otro tipo de marcador genético, como las secuencias alfa pericentroméricas DXZ1 y DYZ3 de los cromosomas X y Y (Wayne, 1985; Wolfe, 1985; Witt 1989).
3. Los *kit* de identificación genética forense de última generación, como el **PowerPlex® FusionSystem** de Promega (Catálogo 2013, DC2402 y DC2408), incluyen el marcador masculino-específico DYS391 que bandea alrededor de los 450 pb “para detectar los alelos Y nulos producto del gen AMEL”.

Determinación del sexo mediante el uso de las secuencias alfa DYZ3

La estructura del genoma humano: El genoma humano puede dividirse en grandes categorías de acuerdo a la estructura y la función de las secuencias.

1. **Secuencias codificantes y reguladoras:** Las regiones que codifican y regulan la síntesis de proteínas se llaman genes. Luego que fue culminada la secuenciación del genoma humano se estima que contiene de 20.000 a 25.000 genes. Un 25% del genoma está relacionado con secuencias génicas pero de este porcentaje solo el 1,5% codifica proteínas y el restante 23,5% está envuelto en regulación de genes lo que incluye secuencias promotoras, *enhancers* (potenciadores), represores, señales de poliadenilación. En su mayoría estas secuencias están constituidas por intrones, pseudo genes y fragmentos de genes (Jasinska, 2004).
2. **Secuencias extragénicas:** El 75% del genoma humano es secuencia extragénica, de la cual 21% es de copia única cuya función aún permanece desconocida y el restante 54% son secuencias repetidas, de éstas, el 45% representa a secuencias repetidas intercaladas (separadas por segmentos de secuencia única), dispersas por el genoma y el restante 9% consiste de secuencias repetidas en tándem compuesto por Satélites, Minisatélites y Microsatélites (Jasinska, 2004).

Las secuencias repetidas en tándem forman parte del ADN conocido como Satélite. Recibe este nombre porque las repeticiones contiguas de secuencias discretas de ADN provocan que las frecuencias de los nucleótidos (A, T, G y C) en estas zonas sean diferentes a las del resto de la masa de ADN no repetido, esto conduce a que sus densidades sean diferentes y se forme una banda “satélite” cuando el ADN total es separado por centrifugación en gradientes de densidad (Jasinska, 2004).

Las secuencias alfa:

El centrómero es una región especial del ADN de los cromosomas eucariotas, esencial para que ocurra la separación de las cromátidas después de la replicación del genoma durante la división celular.

El ADN satélite alfa, es una familia, primate específica, de secuencias repetidas en tándem presentes en las regiones centroméricas de todos los cromosomas humanos. Las secuencias alfa son específicas en la mayoría de los cromosomas, con la excepción de los cromosomas 1/5/19, 13/21 y 14/22 que comparten la misma secuencia repetida, cada uno dentro de su grupo, por ello no pueden ser diferenciados utilizando sus secuencias alfa.

La unidad básica de repetición en el cromosoma Y (secuencia alfoide DYZ3) es un monómero de 170 pb de longitud con alrededor de 100 repeticiones. Los oligómeros seleccionan el núcleo de repetición, así aunque existan mutaciones o deleciones en la zona, el número de copias

aumenta la probabilidad de que no desaparezca la secuencia blanco por completo, porque ella misma esta repetida.

Kit Comercial Moderno

La frecuencia de alelos AMELY nulos detectados en estudios de algunas poblaciones, ha ocasionado que las casas comerciales decidieran incluir un nuevo marcador específico del cromosoma Y, “DYS391”, para subsanar el problema ocasionado por éstos.

Uno de ellos es el **PowerPlex® FusionSystem** de Promega, ofrecido en el año 2013, es un kit multiplex de 24 locus, el cual se puede utilizar para aplicaciones de pruebas de identificación humana, incluyendo análisis forense y *test* de relaciones familiares o filiación.

Es un sistema que permite la co-amplificación y la detección por fluorescencia de los 13 loci del *CODIS* (Norte Americano) (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11, y los 12 loci del estándar Europeo (TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 y D12S391) y AMEL para la determinación del sexo, en adición contiene el locus DYS391, el cual es un marcador específico para el sexo masculino, el cual se incluye para identificar lo alelos nulos en Y presentes en la población.

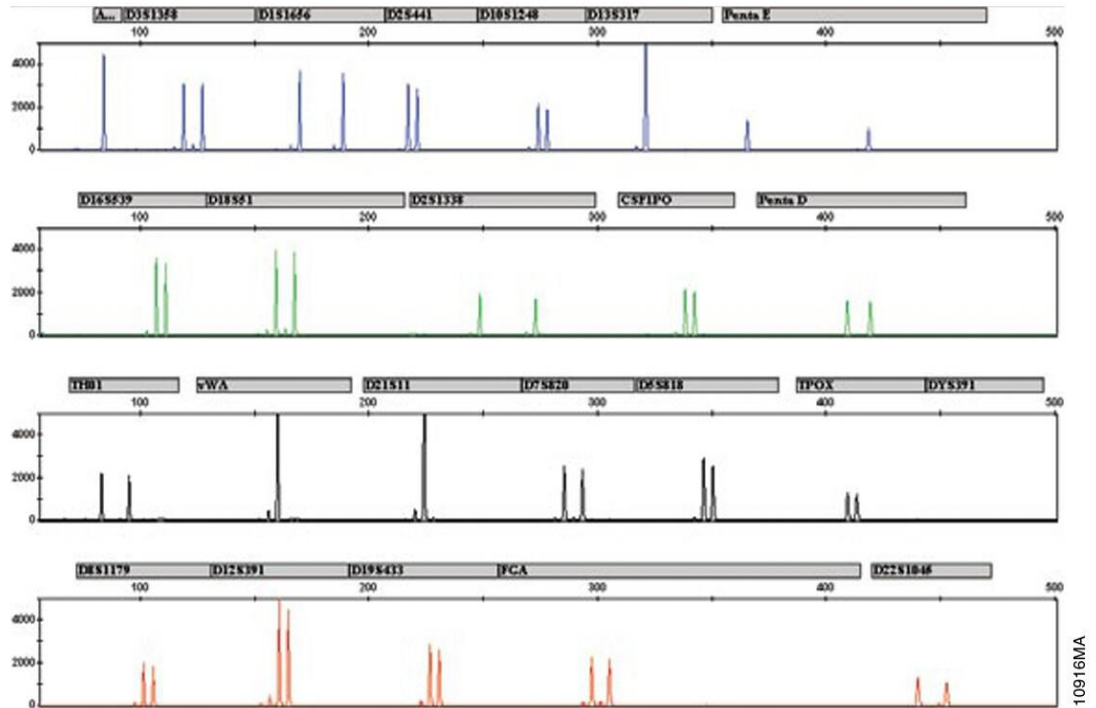


Figura 8. Electroferograma, donde se muestra el resultado de la amplificación de ADN, de una muestra femenina, con el kit **PowerPlex® FusionSystem** (Tomada del catálogo Promega 2013, DC2402 y DC2408).

En la figura 8 se observa el resultado de la prueba de identificación genética, realizada con una muestra de ADN, obtenida mediante un hisopado bucal. En la parte superior izquierda de esta figura se puede observar el pico correspondiente al cromosoma X, identificado con el marcador AMEL. Al final del tercer segmento del electroferograma no se observa ningún pico, donde corresponde el marcador DYS391, corroborando así que se trata de una muestra femenina normal.

Como hemos visto, el reconocimiento de cuán importante es la existencia de alelos AMELY nulos en poblaciones es muy reciente.

Origen de esta línea de investigación

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

ANTECEDENTES

El gen AMEL fue descrito originalmente por Nakahori y colaboradores, luego de clonarlo y secuenciarlo (Nakahori, 1991).

Fichman y colaboradores (1991), analizaron por electroforesis extractos de proteína amelogenina, encontraron que existía una diferencia en los componentes de la proteína dependiendo del sexo del individuo de donde se tomaba la muestra. La proteína madura codificada en el cromosoma X tiene una masa molecular 19,8 KDa y está formada por 175 aminoácidos (aa), mientras la codificada en Y tiene 176 aa y masa molecular 20 KDa. El residuo 29 (metionina) del producto codificado en Y no está presente en el producto codificado en X (Fichman, 1991).

Las diferencias detectadas en las secuencias de las dos copias del gen AMEL, permitieron desarrollar un método de identificación del sexo, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El uso de un par de cebadores de una región homóloga en X y Y, resulta en fragmentos (amplicones) de diferentes longitudes, X (977 pb) Y (788 pb) (Nakahori, 1991).

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

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

Algunos estudios han reportado mutaciones en los cromosomas X y Y, que afectan el gen AMEL y pueden causar fallos en los amplicones de AMELX o AMELY, resultando en una incorrecta identificación del sexo, como se muestra en la figura 9. (Santos, 1998; Roffey, 2000; Thangara, 2002; Chang, 2003; Shadrach, 2004; Lattanzi, 2005; Kashyap, 2006; Mark, 2007; Xueling, 2012).

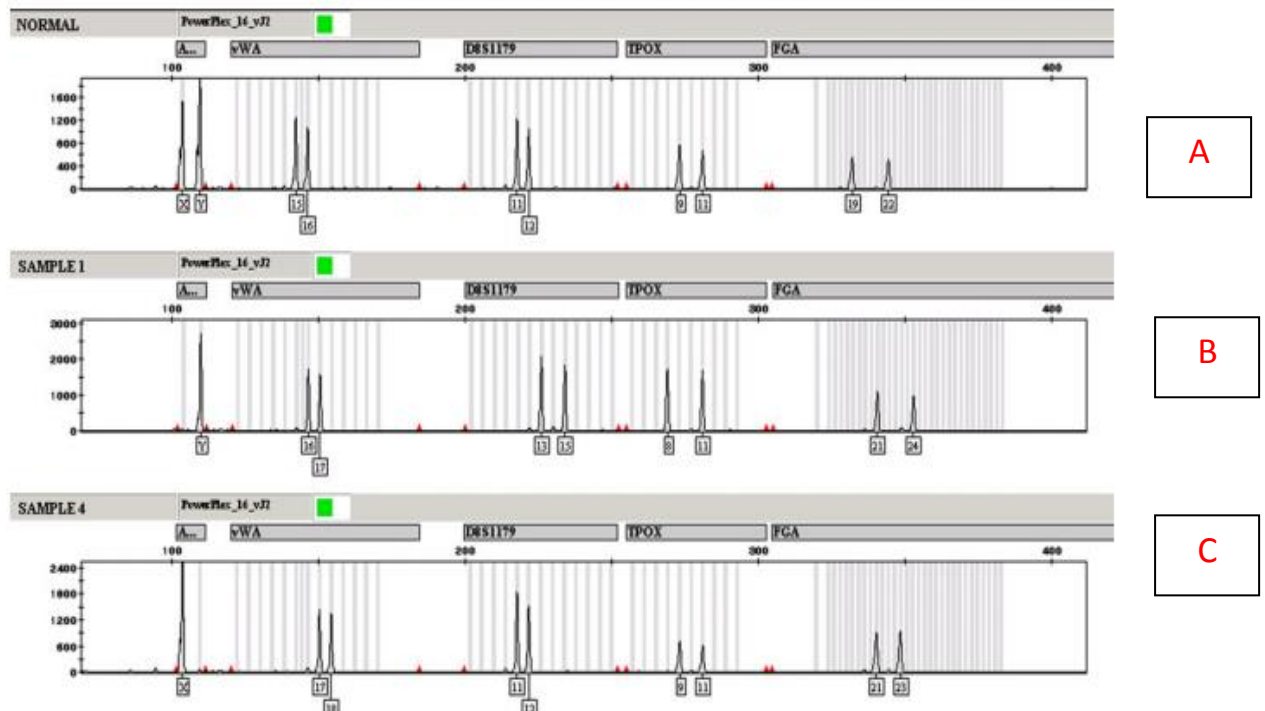


Figura 9. Electroferogramatípico, (A) muestra de un varón normal, (B) un varón con un alelo nulo AMELX, (C) un varón con un alelo nulo AMELY. (Imagen tomada de Xueling, 2012).

El caso que puede conllevar a una incorrecta identificación del sexo es el AMELY nulo, figura 9 muestra C, donde solo se observa la amplificación del gen AMELX, por lo que se puede identificar erróneamente como un femenino.

Diversos estudios han reportado una mutación de C por G, donde se une el iniciador reverso en el gen AMELY que interfiere y limita el uso de la prueba, ocasionando que los varones sean identificados como mujeres (falsos femeninos), (Steinlechner, 2002).

Frecuencias de alelos AMELY nulos publicados en diferentes poblaciones

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

País	No. de nulos/ No. de individuos estudiados	Frecuencia (%)	Referencias
China	3 / 8.087	0,037	Xueling (2012)
Malasia (Malayos)	2 / 334	0,599	Chang (2007)
Malasia (Indues)	11 / 315	3,490	Chang (2007)
India	5/270	1,852	Thangaraj (2002)
India	10 / 4.257	0,235	Kashyap (2006)
Australia	22/10.900	0,020	Mitchell (2006)
Italia	1/13.000	0,008	Lattanzi (2005)
Inglaterra	2/2.000	0,100	Chang (2007)
España	1/1.000	0,100	Chang (2007)
Israel	1/96	1,040	Michael (2004)
Austria	6/29.432	0,018	Steinlechner (2002)

Sur de India	1/100	1,000	Chang (2007)
Sri Lanka	2/24	8,333	Santos (1998)
Nepal	5/77	6,494	Cadenas (2007)
Nepal	9/769	1,170	Parkin (2007)
China	18/79.304	0,023	Yan (2012)
Taiwan	3/80.000	0,004	Kao (2007)
Singapur (Indues)	3/175	1,714	Takayama (2009)
Singapur (Malayos)	1/182	0,549	Takayama (2009)

En la tabla 2, se muestran las frecuencias reportadas en diferentes poblaciones. En general, los países europeos y asiáticos como, España y China, presentan unas frecuencias bajas, en contraste con países asiáticos como la India, Sri Lanka donde se reportan las mayores frecuencias de esta mutación.

Uso de electroforesis en geles de acrilamida, en identificación genética.

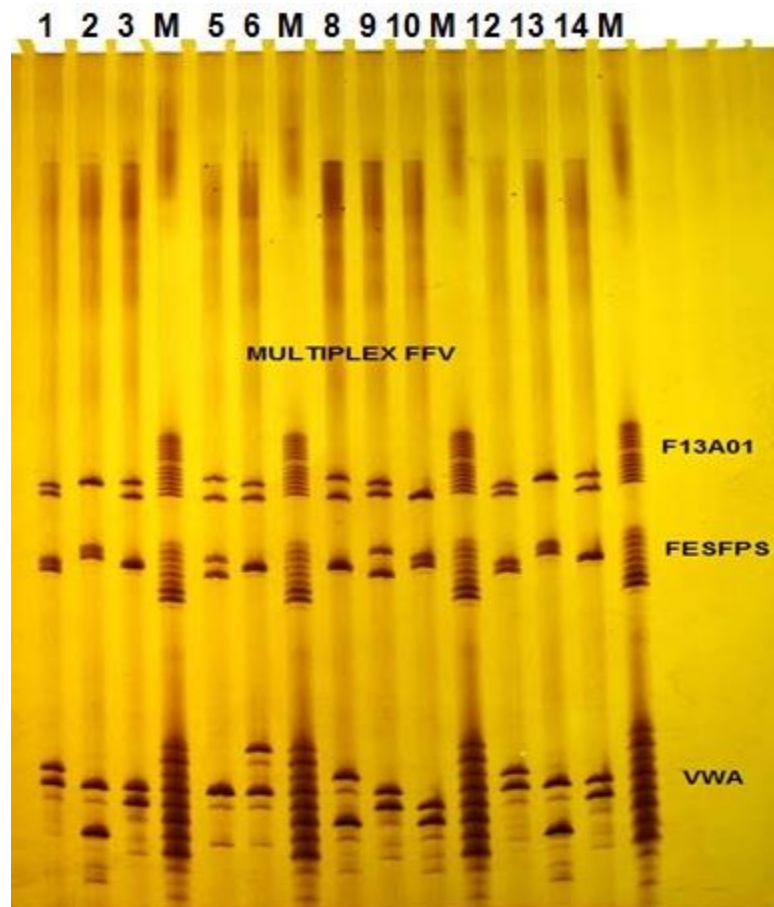


Figura 10. Gel de acrilamida 8%, proporción 19:1, medidas 14 x 22 cm x 0,71 mm, coloreado con nitrato de plata. Se observa la corrida de los productos de amplificación de tres sistemas de marcadores STR autosómicos (Horizontal): F13A01 sistema 1, FESFPS sistema 2, VWA sistema 3, utilizados en identificación genética, ejemplo pruebas de filiación. Cada carril enumerado (1 a 14) representa a un individuo, M marcador de peso molecular para cada sistema. Imagen suministrada por el Laboratorio de Genética Humana, IVIC.

En la figura 10, carril 1 se observa una muestra problema que es heterocigoto en los tres sistemas, en el carril 2 la muestra problema resultó homocigoto en el primer sistema y heterocigoto en los otros dos sistemas.

La identificación genética con estos 3 sistemas de la figura 10, no permite la determinación del sexo, puesto que se tratan de marcadores ubicados en cromosomas autosómicos, F13A01 locus 6p24.3-p25.1, FESFPS locus 15q25-qter, vWA 12p12-pter.

Salvador (2008) utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, para visualizar los amplicones generados por la PCR realizada con los oligómeros de Sullivan, para la identificación de sexo de una muestra de la población Sinaloa, México.

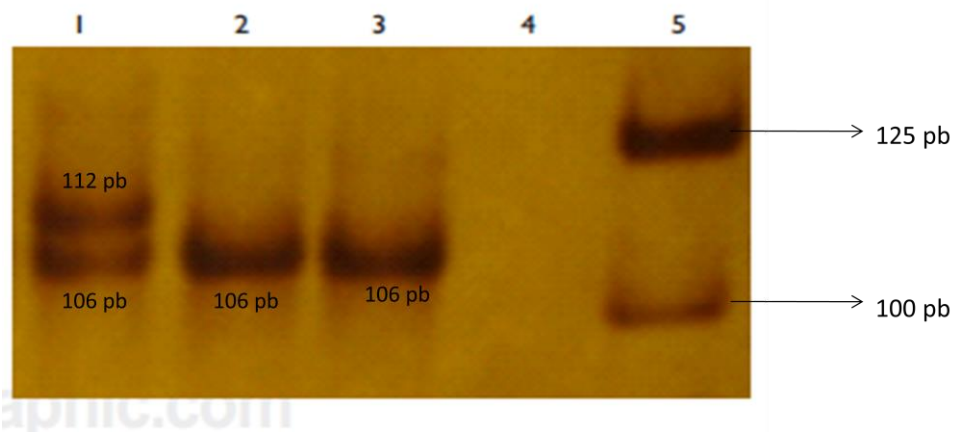


Figura 11. Gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata, en cual se observa en el carril 1 dos bandas, una de 112 pb y de 106 pb (masculino); en los carriles 2 y 3 una sola banda de 106 pb (femenino); carril 4 control negativo; carril 5 el marcador de peso molecular de 25 pb, donde observan las bandas de 100 pb y 125pb. (Imagen tomada de Salvador, 2008).

En la figura 11 se observan los productos de amplificación (112 pb AMELY y de 106 pb AMELX), donde la presencia de una sola banda es indicativo de un femenino y dos bandas de un masculino.

En las figuras 10 y 11, se muestra como la técnica de electroforesis en acrilamida se usa rutinariamente para poder visualizar los resultados de PCR de producto final, como lo que utilizamos en este trabajo.

El uso de las metodologías de Identificación Genética Forense han sido muy limitadas en nuestro país, por esta razón no se han realizado estudios donde se haya reportado la existencia de alelos AMELY nulos.

Por ello con este trabajo se pretende iniciar el estudio de las características del gen AMELY en la población venezolana.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Estudiar el gen AMELY en una muestra de la población masculina venezolana e identificar alelos AMELY nulos.

Objetivos Específicos:

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Población:

La población de este estudio estuvo conformada por 332 donantes de sangre masculinos no relacionados, 145 procedentes del Hospital General de los Valles del Tuy “Simón Bolívar” y 187 del “Hospital Universitario de Caracas”.

Se utilizaron 10 muestras de ADN de donantes femeninas como control interno del sistema.

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

A cada voluntario se le extrajeron 5 ml de sangre periférica por punción venosa, que fueron colectados en tubo con anticoagulante EDTA, tapa morada estándar.

Extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre

La muestra se dejó en reposo unas horas o durante la noche en la nevera a 4°C, lo que permite que se separen por sus densidades los componentes de la sangre en dos grandes grupos; los glóbulos rojos, más densos, en la parte inferior del tubo y los glóbulos blancos, menos densos que flotan sobre los primeros, esta capa de células blancas conocida en la literatura como el “*Buffy Coat*” figura 12, se extrajo con pipeta Pasteur o punta desechable de 1.000 µL. El volumen extraído fue aproximadamente 2 mL.

Extracción de ADN



Figura 12. Componentes en sangre separados por densidad, donde se puede diferenciar de arriba hacia abajo, la primera capa conformada por el plasma, una capa intermedia el “*Buffy Coat*” y al fondo la capa de glóbulos rojos.

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

El “Buffy Coat” se trasvasó a tubo cónico de 15 mL se le añadieron 9 ml de RCLB, mezclado por inversión varias veces y se dejó reposar por 5 min, luego la muestra se centrifugó a 1.050 g por 30 min, en centrífuga clínica, se descartó el sobrenadante, se lavó una vez más con 9 ml de RCLB y se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 600 μ L de NLB + SDS. La muestra se transfirió a un vial Eppendorf de 2 mL y se incubó a 56°C por tres horas o hasta que se disolviera el sedimento. Luego se añadieron 100 μ L de NaCl 6 M, se mezcló vigorosamente con el vórtex, se añadieron 600 μ L de cloroformo y se agitó nuevamente con el vórtex hasta que se formó una emulsión lechosa. Luego se centrifugó a 15,6 g por 15 min en mini centrífuga, al finalizar la centrifugación se transfirió la fase acuosa (superior) que contiene el ADN a un vial nuevo de 2 mL. Se añadió 1 mL de etanol 100% bien frío y se agitó por inversión varias veces hasta que precipitó la red de ADN, figura 13. La muestra se centrifugó a 15,6 g por 15 min y se descartó el alcohol. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 1 mL de etanol 70%, bien frío, luego se centrifugó a 15,6 g por 15 min, se descartó el alcohol y se dejó secar los tubos (abiertos en la campana) por 30 min. Transcurrido el tiempo se añadieron 100 μ L de agua destilada inyectable y finalmente se incubó a 65°C por 15 min. En este punto el ADN estuvo listo para PCR.

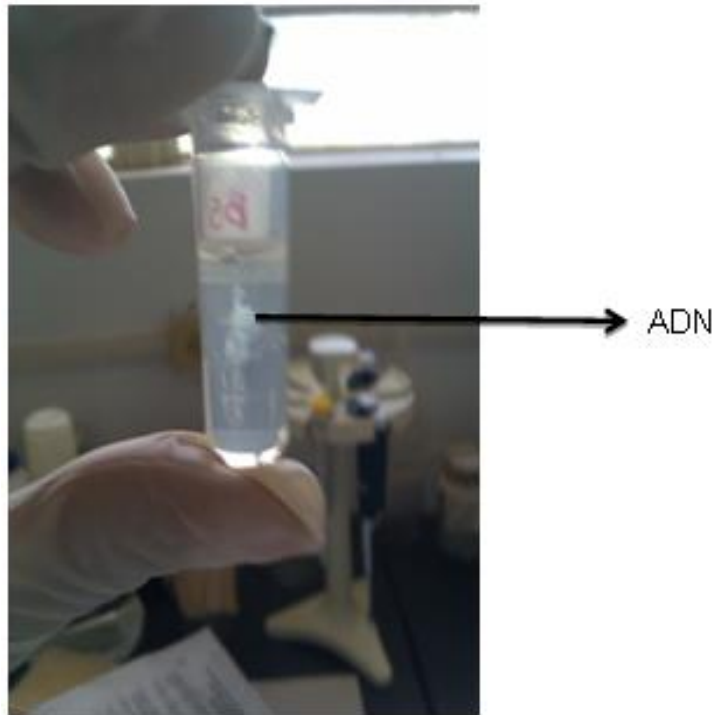


Figura 13. Precipitación del ADN, se observa la red de ADN que precipitó después de añadir etanol 100%.

Cuantificación Cualitativa del ADN Extraído:

El ADN extraído se cuantificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 0,5X (Tris-HCl 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5), en una cámara MiniRun GE – 100, corriendo 8 μ L de la muestra. El ADN fue visualizado con bromuro de etidio, de tal modo se pudo evaluar el rendimiento del ADN extraído que fue utilizado para PCR.

Determinación del sexo mediante uso del gen AMEL:

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

A continuación en la tabla 3, se describen los oligómeros empleados señalando sus secuencias nucleotídicas y el tamaño del producto de amplificación que generaron.

Tabla 3. Secuencia de los oligómeros S1 y S2

Nombre	Secuencia	Tamaño de los fragmentos esperados
S1	5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3'	Para X 106 pb
S2	5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'	Para Y 112 pb

En los casos donde se encontró una discrepancia entre la información sobre el sexo de cada donante y los resultados de la prueba, se procedió a repetir la prueba con la segunda pareja de oligómeros propuesta por Sullivan (S3 y S4).

A continuación en la tabla 4, se describen los oligómeros empleados señalando sus secuencias y el tamaño del producto de amplificación que generaron.

Tabla 4. Secuencia de los oligómeros S3 y S4

Nombre	Secuencia	Tamaño de los fragmentos esperados
S3	5'-ACCTCATCCTGGGCACCCTGG -3'	Para X 212 pb
S4	5'-AGGCTTGAGGCCAACCATCAG -3'	Para Y 218 pb

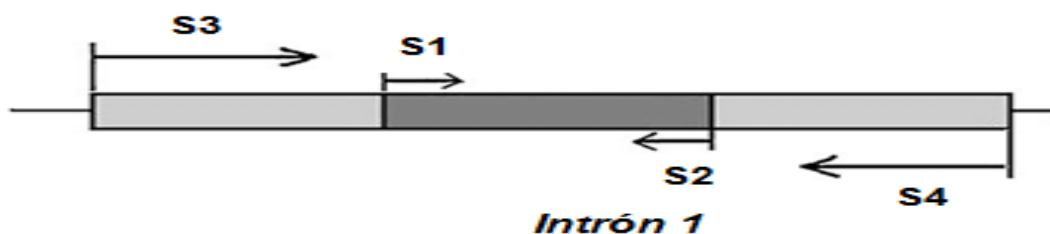


Figura 14. Sitios de alineamiento de los oligómeros propuestos por Sullivan, en la secuencia del gen AMEL. (Imagen tomada de Xueling, 2012).

Los dos pares de oligómeros que se muestran en la figura 14, flanquean la secuencia del intrón 1 del gen y los amplicones generados tienen 6 pb de diferencia entre ellos, en ambos casos, ya que flanquean la misma delección presente en AMELX.

Reacción de PCR

Siguiendo las indicaciones del fabricante de la polimerasa, la amplificación de los fragmentos se realizó en una mezcla de reacción, de volumen final 13 μL , que contenía 0,625 u/ μL de GoTaqFlexi DNA Polymerase (Promega), 0,17 pmol/ μL de los oligómeros S1 y S2, 0,4mM de dNtP's (Promega), Buffer 5X Green a una concentración final 1X, 1,25 mM MgCl_2 (Promega), H_2O cantidad suficiente para 8 μL volumen final.

Se repartieron 8 μL /vial de la mezcla, se agregaron 5 μL de ADN, para un volumen final de 13 μL .

Condiciones del termociclador para PCR

En la siguientes tablas 5 y 6, se especifican las condiciones del termociclador "TECHNE TC – 3000x", que se utilizaron para la PCR del gen AMEL.

Tabla 5: Condiciones para PCR con oligómeros S1 y S2

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

Tabla 6: Condiciones para PCR con oligómeros S3 y S4

Condiciones		
Entrada	95°C X 1 min.	
Desnaturalización	95°C X 1 min.	
Alineamiento	54°C X 1 min.	30 Ciclos
Extensión	72 °C X 1 min.	
Salida	72 °C X 10 min.	

Se procedió a realizar el ensayo con la secuencia alfa DYZ3, la segunda prueba alternativa sugerida, para la verificación del sexo, en las muestras que se encontró discrepancia entre el sexo conocido y el sexo identificado.

A continuación, en la tabla 7, se describen los oligómeros empleados señalando sus secuencias nucleotídicas y el tamaño del producto de amplificación que generaron.

Tabla 7. Secuencia de los oligómeros Y1 y Y2

Nombre	Secuencia	Tamaño de los fragmentos esperados
Y1	5'-ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG-3'	Para Y 170 pb
Y2	5'-AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC-3'	Para X no amplifica

Reacción de PCR

La mezcla de reacción para esta PCR es idéntica a la descrita anteriormente, con volumen final 13 µl.

Condiciones del termociclador para la PCR

En la siguiente tabla 8, se especifican las condiciones del termociclador “TECHNE TC – 3000x”, que se utilizaron para el PCR de la secuencia alfa DYZ3.

Tabla 8: Condiciones para PCR con oligómeros Y1 y Y2

Condiciones		
Entrada	95 °C X 2 min.	
Desnaturalización	95°C X 1 min.	
Alineamiento	55 °C X 1 min	30 Ciclos
Extensión	72 °C X 1 min.	
Salida	72 °C X 10 min.	

Los productos finales de las PCR se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida no desnaturizantes, teñidos con nitrato de plata.

Cálculos

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

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

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

RESULTADOS

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

Cuantificación cualitativa del ADN extraído

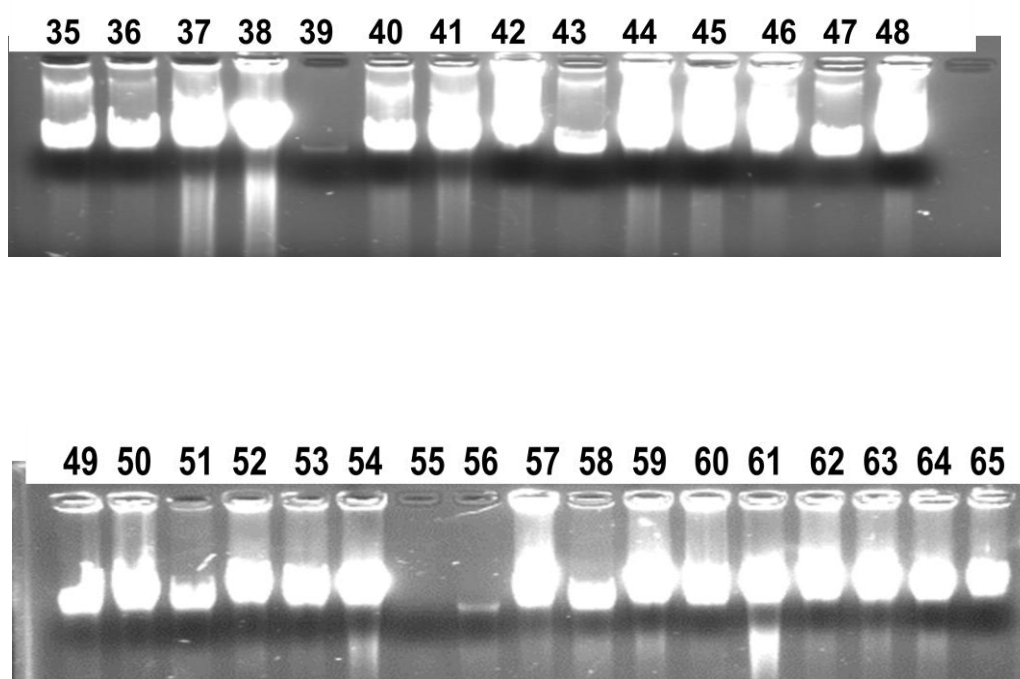
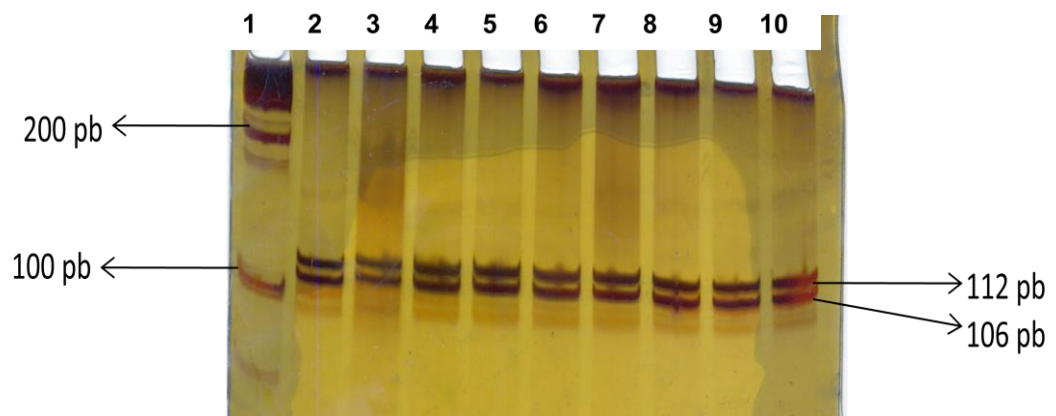


Figura 15. Corrida rápida en gel de agarosa 1%, el ADN se visualiza con bromuro de etidio, iluminado con luz ultra violeta. Cada bolsillo representa el ADN extraído a partir de muestras de sangre de cada uno de los donantes.

En la figura 15, se muestra un lote del ADN extraído de 31 donantes. En general el protocolo de extracción utilizado rinde un ADN de buena calidad, apto para PCR en la mayoría de los casos, con algunas excepciones, como los bolsillos 39, 55, 56 donde falló la extracción.

Identificación de sexo por PCR con oligómeros S1 y S2, propuestos por Sullivan.

(A)



(B)

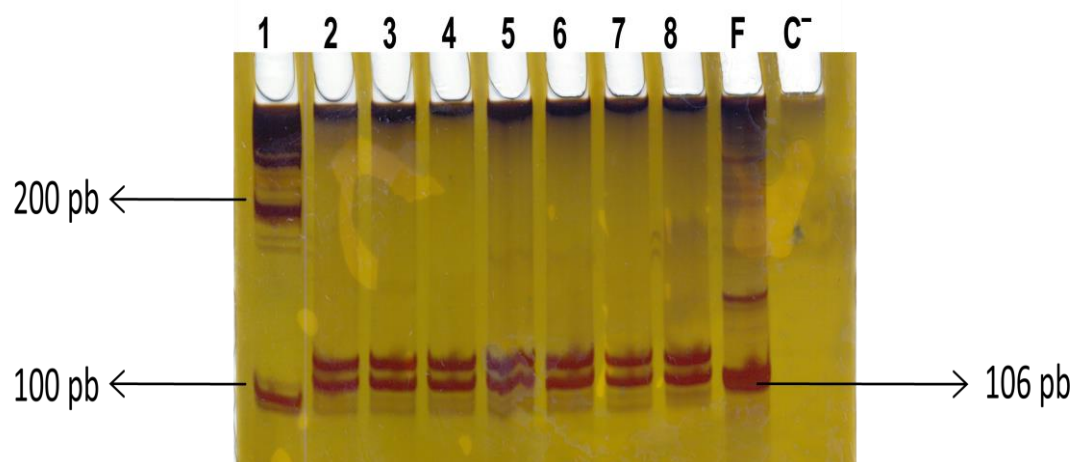


Figura 16. Geles de acrilamida 10% proporción 19:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. **(A)** Carril 1 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles del 2 al 10 muestras de donantes masculinos. **(B)** Carril 1 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles del 2 al 8 muestras de donantes masculinos, F donante femenino, C⁻ control negativo.

En la figura 16, se muestran las electroforesis de rutina, de los productos de amplificación de muestras masculinas, obtenidos por PCR con los oligómeros S1 y S2 de Sullivan, donde se logra observar claramente la doble banda que indica que las muestras provienen de donantes masculinos.

Se visualiza una banda de 112 pb la cual identifica al cromosoma Y y una banda de 106 pb que identifica al cromosoma X, el cual es el perfil clásico de un individuo masculino, presente en todos los carriles de la imagen (A), figura 16.

En la imagen (B) de la figura 16, en el carril F se encuentra el amplicón obtenido por PCR con los oligómeros S1 y S2 de Sullivan, de una donante femenina, que se utilizó como control interno del sistema. Se observa una única banda de 106 pb, la cual identifica al cromosoma X, el cual es el perfil clásico de un individuo femenino.

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

Identificación de posibles AMELY nulos.

En las siguientes figuras se muestran, las corridas electroforéticas de amplicones obtenidos por PCR con oligómeros S1 y S2, donde se observaron discrepancias entre el sexo de la muestra donante y el obtenido según la prueba.

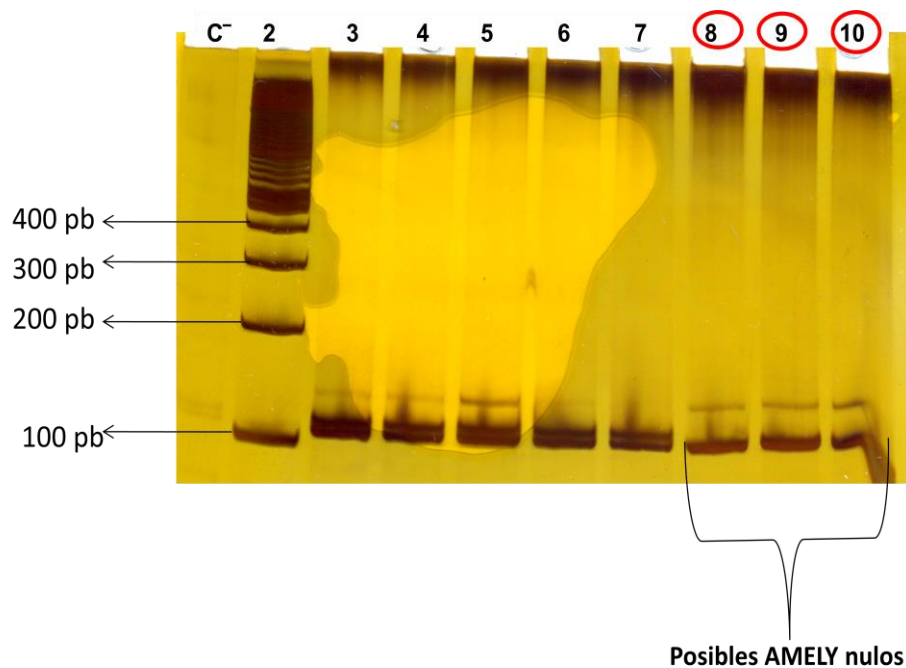


Figura 17. Gel Acrilamida 15% proporción 29:1, corrida 45 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carril C⁻ control negativo, carril 2 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles 3 a 10 muestras de donantes masculinos.

En la figura 17, los carriles 8, 9 y 10 se pueden evidenciar muestras masculinas, donde no se observa la doble banda del perfil típico de varones, solo se observa una banda asemejándose entonces al perfil femenino. Se denominó a estos casos particulares posibles AMELY nulos, los cuales son el objetivo de estudio en este proyecto.

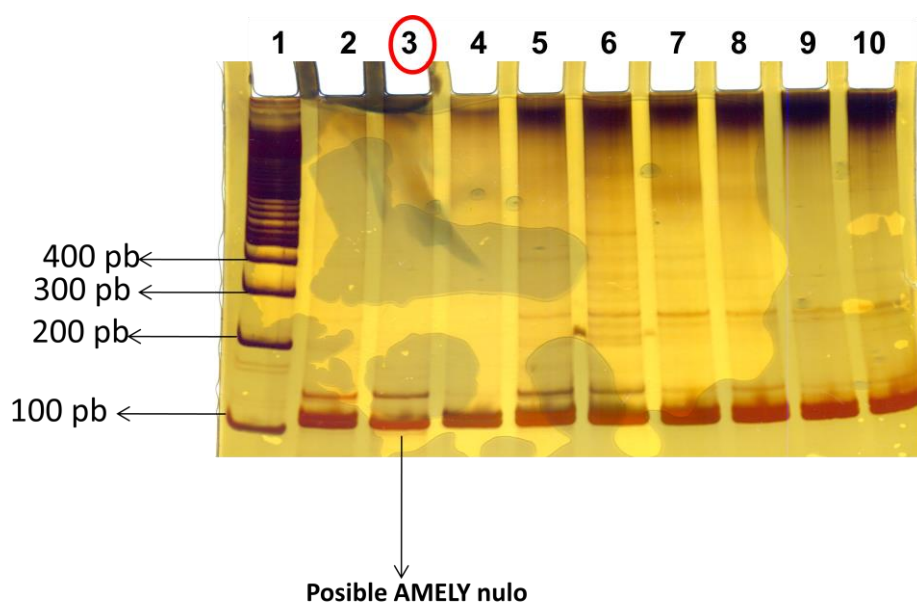


Figura 18. Gel de acrilamida 15%, proporción 29:1, corrida 45 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carril 1 marcador de peso molecular (Promega G6951). Carriles 2 al 10 muestras de donantes masculinos.

En la Figura 18, carril 3 se observa un cuarto caso de posible AMELY nulo.

La resolución en los geles de acrilamida (figuras 17 y 18) se mejoró modificando la proporción acrilamida : bisacrilamida, la concentración final y el amperaje de la corrida para lograr una imagen más nítida y se pueda apreciar mejor la doble banda. La formulación original, proporción 29:1 y 15 % concentración final se cambió por 19:1 y 10 % concentración final mejorando notablemente la separación y la calidad fotográfica como se demuestra en las figuras 16 y 19.

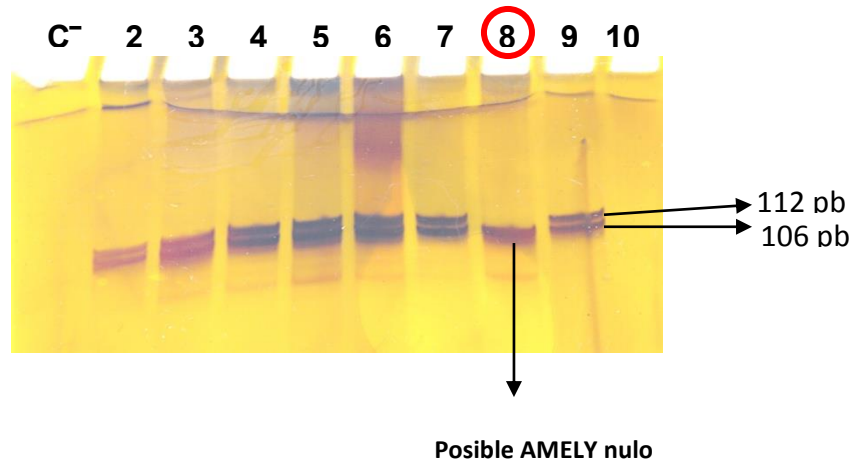


Figura 19. Gel de acrilamida 10% proporción 19:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carril C⁻ control negativo, carriles del 2 al 10 muestras de donantes masculinos.

En la figura 19, carril 8 se puede observar el quinto caso de posible AMELY nulo encontrado.

Tras la realización de la identificación de sexo en las 332 muestras de donantes masculinos, se encontraron 5 casos de posibles AMELY nulos, que con las siguientes pruebas alternativas, se pudo esclarecer el sexo verdadero del donante.

Los cinco posibles AMELY nulos.

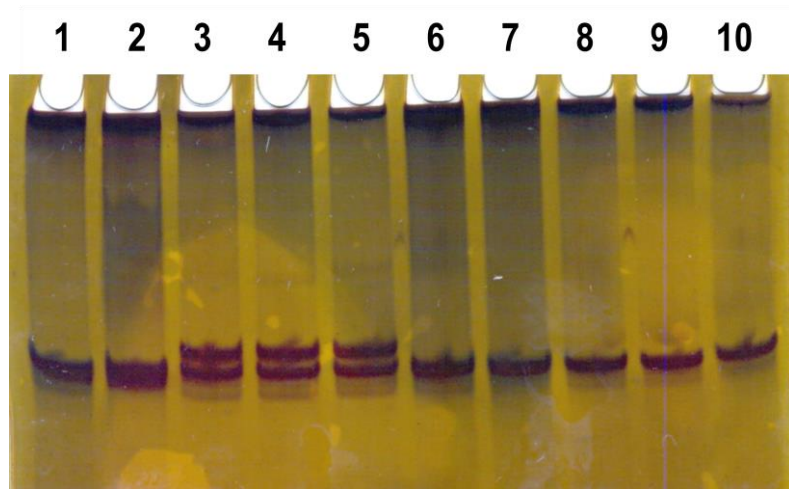


Figura 20. Gel de acrilamida 10% proporción 19:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carriles 1 y 2 muestras de donantes femeninos de sexo conocido, carriles 3, 4 y 5 muestras de donantes masculinos de sexo conocido, carriles 6 al 10 posibles AMELY nulos.

En la figura 20 se muestra la corrida electroforética de los productos de amplificación del PCR con los oligómeros S1 y S2, en gel se observan dos muestras femeninas y tres masculinos de sexo conocido los cuales se utilizaron como control interno del sistema, para comparar el perfil obtenido con él de muestras de los cinco posibles AMELY nulos.

Verificación del sexo de los posibles AMELY nulos detectados en la muestra de población.

Las 5 muestras problema estaban identificadas como masculinos; Carril 6 AMELY nulo (Santiago), carril 7 AMELY nulo (Ignacio), carril 8 AMELY nulo (Boris), carril 9 AMELY nulo (Gadel), carril 10 AMELY nulo (Pedro) figura 20. Se muestran los nombres de pila que estaban en el rotulo de los correspondientes tubos de sangre provenientes del Hospital “Simón Bolívar” de los Valles del Tuy.

Identificación de sexo por PCR con los oligómeros alternativos S3 y S4, propuestos por Sullivan.

Tras la obtención de los cinco posibles AMELY nulos, se procedió a realizar las pruebas alternativas propuestas en este proyecto, para esclarecer el sexo de estas muestras sospechosas, corroborar si se trata de un individuo de sexo masculino con una mutación en AMELY o se trata de un individuo femenino. En las figuras que siguen se muestran los resultados de la PCR con los oligómeros S3 y S4

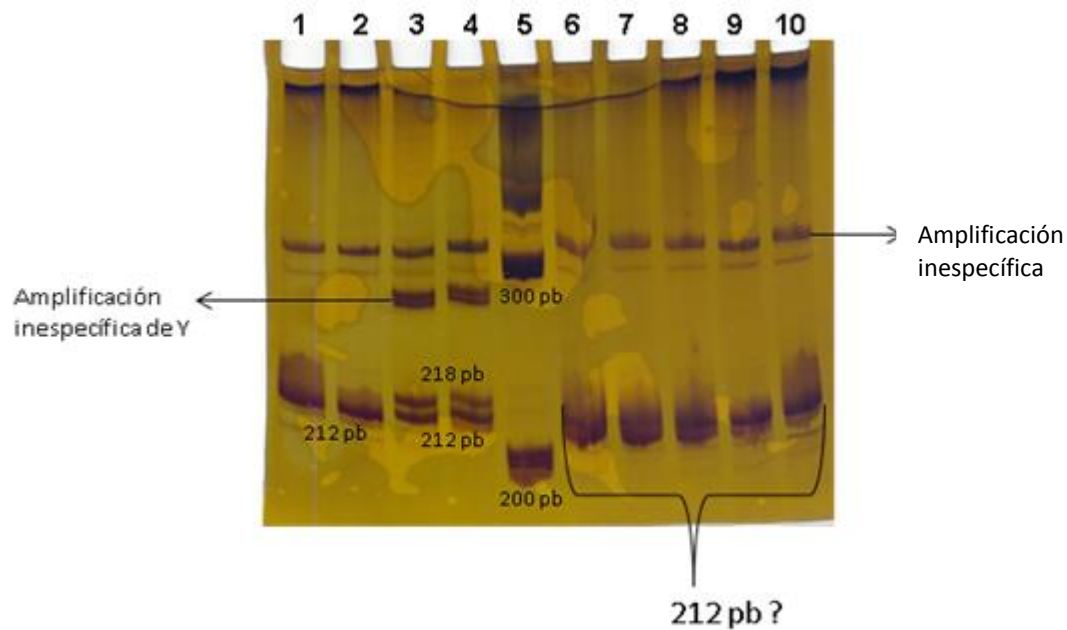


Figura 21. Corrida rápida en gel acrilamida 8%, proporción 19:1, corrida 140 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carriles 1 y 2 muestras de donantes femeninos de sexo conocido, carriles 3 y 4 muestras de donantes masculinos de sexo conocido, carril 5 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles 6 al 10 muestras posibles AMELY nulos.

Esta es una prueba rápida, orientadora, donde se puede observar utilizando como referencia las muestras masculinas y femeninas (control interno), ubicadas del lado izquierdo del marcador de peso molecular, que las cinco muestras sospechosas de ser AMELY nulos, parecen provenir de donantes femeninos. En las muestras control masculinas se observa la doble banda característica. Las muestras control femeninas y las muestras problema son muy similares. Además se pueden observar algunas amplificaciones inespecíficas, unas presentes en todas las muestras servidas en este gel y otras presentes solo en las muestras provenientes de donantes masculinos, que no invalidan la prueba porque las bandas orientadoras tienen el tamaño esperado de 212 para AMELX y 218 para AMELY, figura 21.

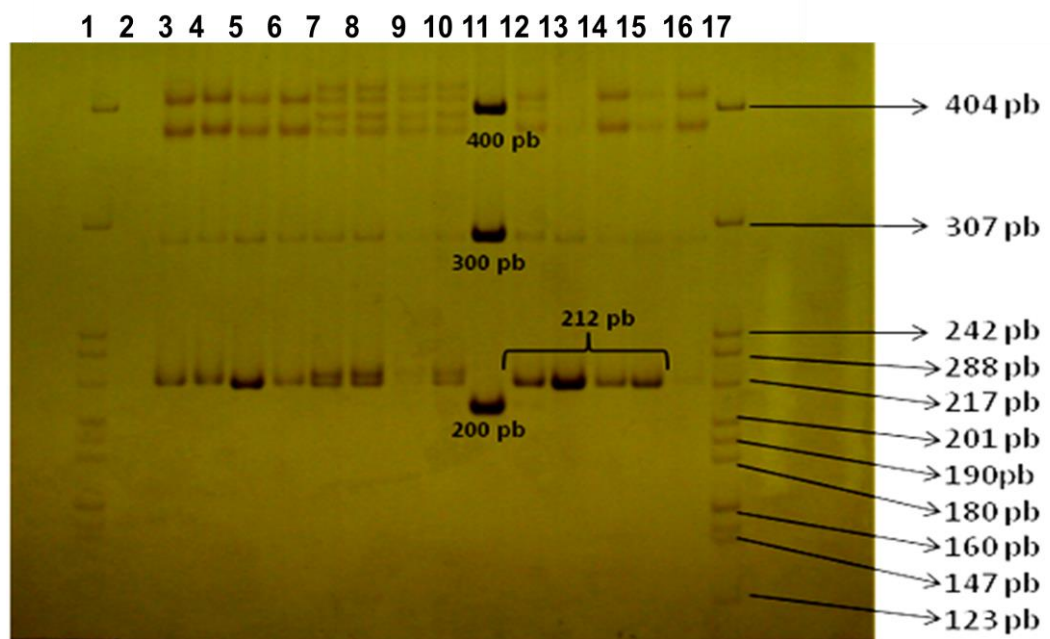


Figura 22. Gel acrilamida 8%, proporción 29:1, corrida 16 horas, medidas 14 x 22 cm x 0,71 mm. Carril 1 escalera pBR322 x Msp I, carril 2 control negativo, carriles 3 al 6 muestras de donantes femeninos de sexo conocido, carriles 8 al 10 muestras de donantes masculinos de sexo conocido, carril 11 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles 12 al 17 muestras posible AMELY nulos.

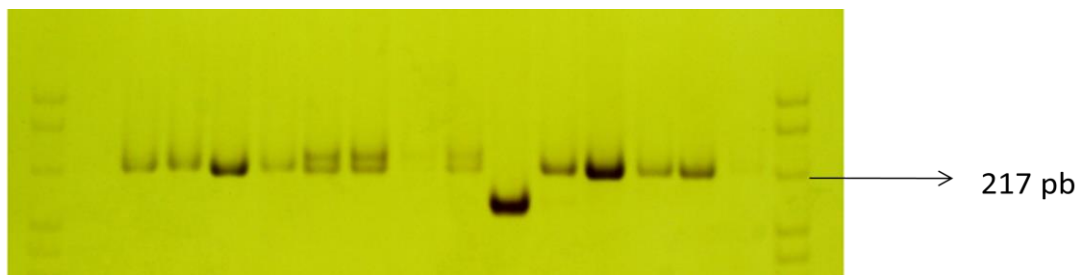


Figura 23. Ampliación de la región de interés de la figura 22, donde se puede observar con mayor claridad las bandas que identifican a cada uno de estos individuos.

En las figuras 22 y 23 se muestra el resultado de la corrida de los amplicones obtenidos con los oligómeros S3 y S4, se cambiaron las condiciones del gel para poder obtener un resultado más estricto, se

utilizó un gel de mayor longitud y un segundo marcador molecular (pBR322 x Msp I), para demostrar que la doble banda masculina y la banda sencilla femenina corresponden con los tamaños esperados. Se evidencia que en las cinco muestras problemas (carriles 12 al 17) no está presente la doble banda característica de las muestras masculinas que son evidentes en las muestras control (carriles 7 al 10).

Identificación de sexo por PCR con el marcador DYZ3.

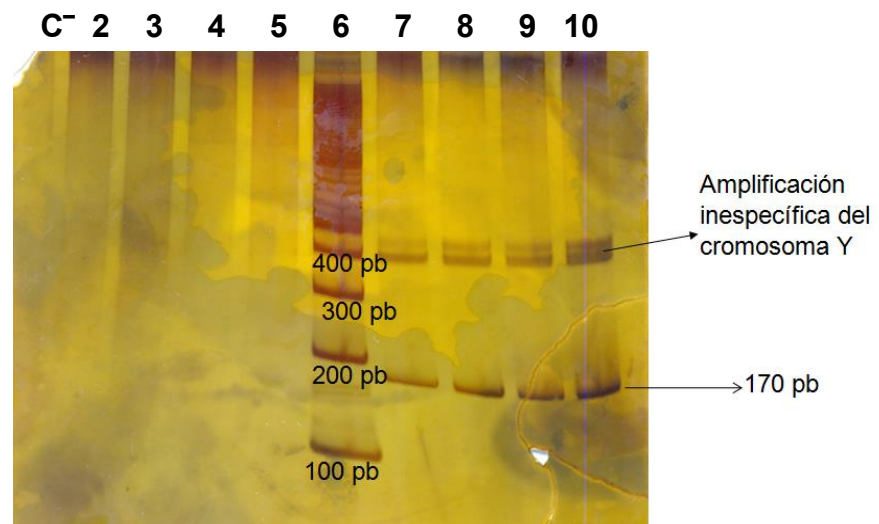


Figura 24. Estandarización de la prueba DYZ3. Gel acrilamida 12%, proporción 29:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carril C⁻ control negativo, Carriles 2 al 5 muestras de donante femeninos de sexo conocido, carril 6 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles 7 al 10 muestras de donantes masculinos de sexo conocido.

En la figura 24, se muestra la corrida de los amplicones obtenidos por PCR de cuatro muestras femeninas y cuatro muestras masculinas, con los oligómeros diseñados para la secuencia del centrómero del cromosoma Y (DYZ3), Se evidencia la ausencia del amplificación en los

carriles correspondientes a las muestras femeninas, mientras que, a la derecha, se evidencia la presencia del amplificado esperado de 170 pb que identifica al cromosoma Y en los cuatro carriles correspondientes a las muestras masculinas.

Identificación del sexo de posibles AMELY nulos

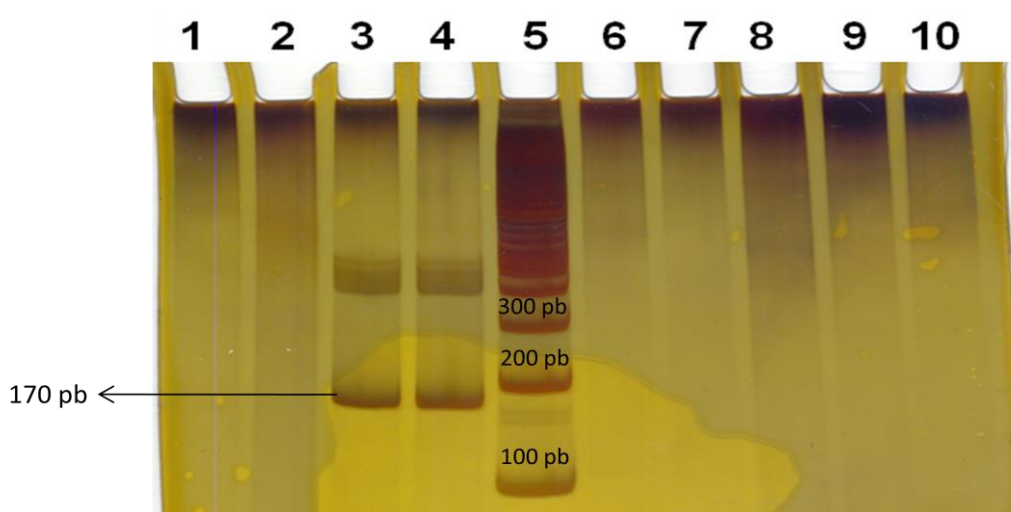


Figura 25. Gel acrilamida 12%, proporción 29:1, corrida 60 min, medidas 7 x 10 cm x 0,71 mm. Carriles 1 y 2 muestras de donantes femeninos de sexo conocido, carriles 3 y 4 muestras de donantes masculinos de sexo conocido, carril 5 marcador de peso molecular (Promega G6951), carriles 6 al 10 muestras de los posibles AMELY nulos.

En la figura 25 se muestra la corrida de los amplicones obtenidos por PCR con los oligómeros diseñados para la secuencia del centrómero del cromosoma Y (DYZ3); al lado derecho los 5 posibles AMELY nulos (carriles 6 al 10) demostraron no poseer el cromosoma masculino Y.

Estos resultados nos permiten aseverar que estas cinco muestras corresponden a cinco donantes femeninos. No encontramos ningún verdadero AMELY nulo.

DISCUSIÓN

En este proyecto nos propusimos estudiar el gen AMELY en una muestra de la población masculina venezolana, donde se logró identificar el sexo de 332 individuos, en principio todos titulados como donantes masculinos, donde 5 de ellos resultaron ser muestras provenientes de donantes femeninos, figura 26. Con la aplicación de las pruebas alternativas propuestas, a estos cinco sospechosos se logró dilucidar el sexo, por lo que se trataba de muestras rotuladas erróneamente.

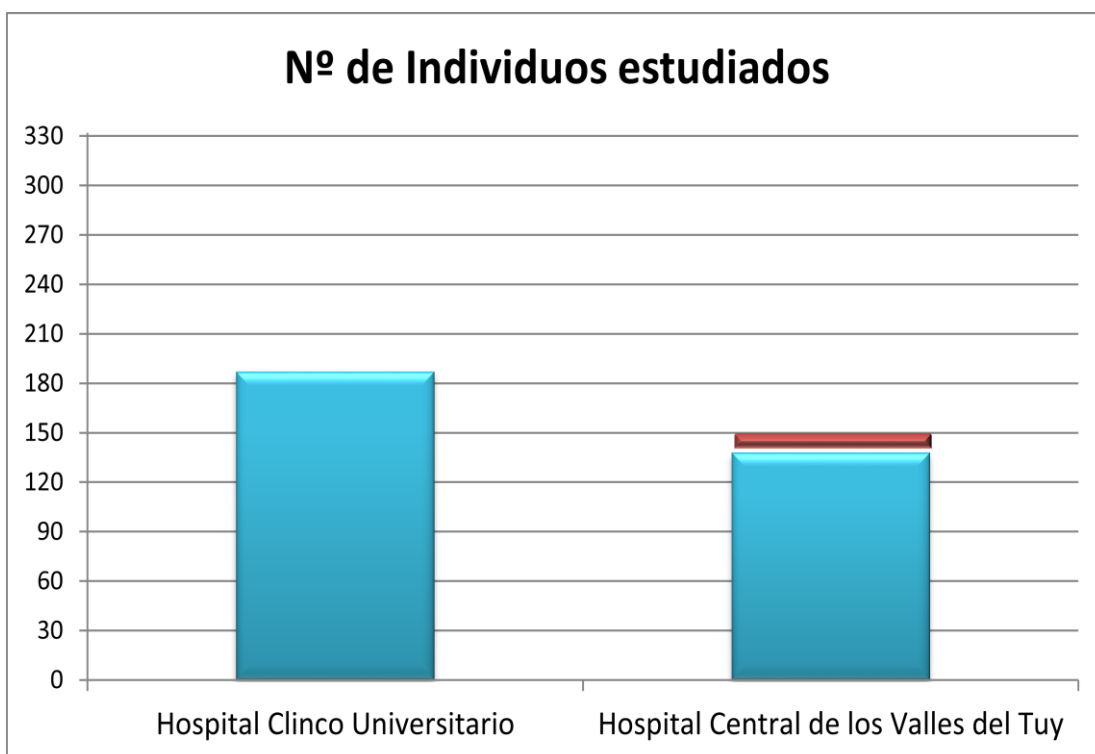


Figura 26. Gráfico de barras del número de individuos estudiados, este indica la cantidad de individuos estudiados (eje Y) y el banco de sangre de procedencia de cada individuo (eje X), las barras azules indican la cantidad de individuos masculinos identificados, la barra roja indica la cantidad de individuos femeninos identificados.

En la figura 26, se describe que de los 145 donantes masculinos provenientes de los Valles del Tuy, 5 resultaron ser femenino (barra roja).

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

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

En este trabajo no se encontró ningún AMELY nulo, esto no indica la inexistencia de la mutación en población venezolana masculina, su frecuencia si existiera, debe ser menor que 0,003% (3 en 1000). Por lo que sería conveniente aumentar el N muestral.

En el caso de que se hallara un verdadero AMELY nulo, se recomienda secuenciar el fragmento, que se pudiera obtener por medio de PCR con oligómeros alternativos como S3 y S4, de este modo se podría saber de qué tipo de mutación se trata.

Hasta ahora se puede afirmar que los oligómeros propuestos por Sullivan, de uso universal en los *kits* de identificación genética, resultaron 100% sensibles y específicos en la población venezolana.

La población mestiza venezolana, está compuesta por los aportes genéticos de las poblaciones europeas, africana e indígena. Existe un primer estudio donde se reporta un estimado de los porcentajes de aportes genéticos de las poblaciones que dan origen a la población mestiza venezolana, donde se refleja una predominancia del aporte europeo de 59%, seguido por el amerindio de 28% y en menos extensión el africano de 13% (Rodríguez-Larralde, 2001). (Ver figura 27).

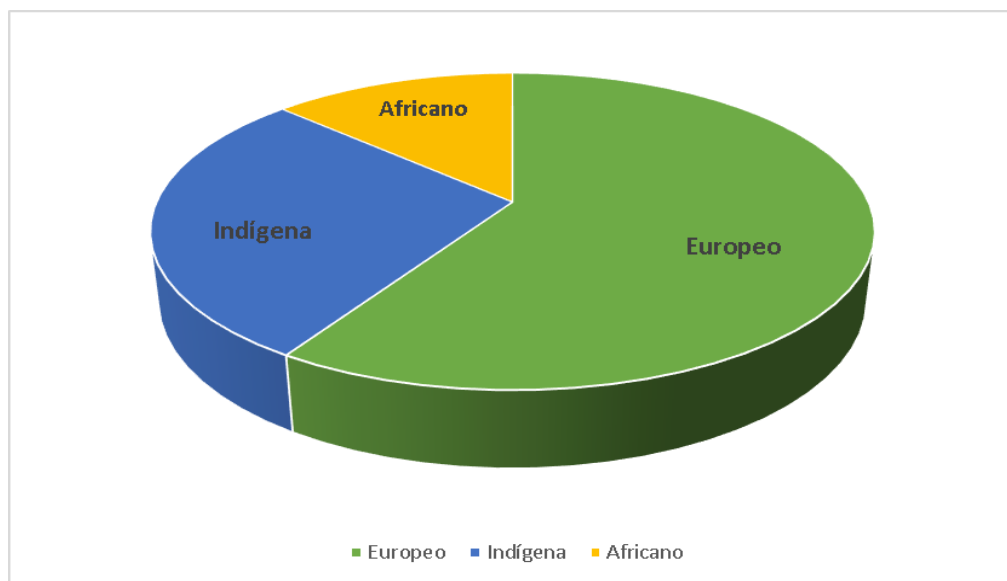


Figura 27. Gráfico que ilustra las poblaciones que conforman el aporte genético de la población mestiza venezolana. El aporte europeo representa 59% del gráfico, el aporte indígena un 28% y el aporte africano un 13%.

El proceso de mezcla que da origen a la población mestiza venezolana comenzó en la colonia y continúa hoy. Durante la colonia diversos factores favorecieron el cruce entre europeos masculinos e indígenas

femeninas en mayor grado, seguido por el cruce de europeo con africano y en menor grado africano e indígena. Luego de la época colonial, la mezcla continuó y más intensamente durante el siglo XX, con una fuente de inmigración española, italiana y portuguesa principalmente, la inmigración africana se limita al período colonial (Castro De Guerra, 2011).

Tabla 9. Estimación de mezcla de la población venezolana, usando marcadores del ADN mitocondrial y del cromosoma Y

	Europeo		Africano		Indígena	
	ADNm	Cromosoma Y	ADNm	Cromosoma Y	ADNm	Cromosoma Y
Población mestiza Venezolana	19 ± 1.5	89 ± 2.4	20 ± 3.6	8 ± 2.1	61 ± 1.9	3 ± 1.1

a. Valores expresados en porcentaje

b. ADNm= ADN mitocondrial

(Tabla tomada de Castro De Guerra et al, 2011)

En la población mestiza venezolana el cromosoma masculino Y es predominantemente de origen europeo (español), mientras que el cromosoma mitocondrial es predominantemente indígena, como se muestra en la tabla 9.

Cabe destacar, en las frecuencias reportadas de la tabla 2, los países europeos están entre las más bajas. Se reporta una frecuencia de 0,1% (1 en 1000) para AMELY nulo en población española, no existen reportes de la distribución de las frecuencias de AMELY nulo en las poblaciones provenientes del África centro-occidental (Benin, Senegal), lugar de origen de nuestros afro-descendientes (Pollak-Eltz, 1972), ni de

nuestras poblaciones indígenas, lo cual no permite efectuar mejores comparaciones, es por ello que se recomienda realizar este tipo de estudios enfocado en estas poblaciones.

El aporte europeo quizás pueda ayudar a explicar la baja frecuencia de AMELY nulos, ya que nuestra ascendencia masculina se ha demostrado que tiene un mayor aporte europeo, pero para poder aseverar esta suposición es conveniente analizar una mayor cantidad de individuos.

CONCLUSIONES

- No se encontró ningún AMELY nulo en los 332 donantes masculinos venezolanos, la frecuencia que podemos reportar hasta ahora es cero, por lo que se hizo innecesario calcular el error típico.
- Se demostró que de la muestra de donantes masculinos, cinco eran donantes femeninos mal identificados.
- Se demostró que indispensable el desarrollo y uso de pruebas alternativas, para esclarecer discrepancias en los resultados de la determinación del sexo, en la identificación genética forense.
- Concluimos, después de la búsqueda en la literatura nacional y comunicación personal con investigadores que se desempeñan en el área, que este es el primer trabajo realizado en nuestro país sobre la identificación del sexo por medio del uso de marcadores del gen AMEL, por lo que se considera importante reproducir y proseguir este estudio con la población venezolana.

BIBLIOGRAFÍA

- Akane, A., Seki, S., Shiono, H., Nakamura, H., Hasegawa, M., Kagawa, M. Matsubara K., Nakahori, Y., Nagafuchi. S. and Nakagome, Y. (1992). Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. *Forensic Sci. Int.* **52**: 143-148.
- Cadenas A.M., Regueiro M., Gayden T., Singh N., Zhivotovsky L.A., Underhill P.A. and Herrera R.J. (2007). Male amelogenin dropouts: phylogenetic context, origins and implications. *Forensic Sci Int.* **166**: 155-163.
- Castro De Guerra D., Figuera Pérez C., M. H. Izaguirre, E Arroyo Barahona, A. Rodríguez Larralde, M. Vívenes De Lugo. (2011). Gender differences in ancestral contribution and admixture in Venezuelan populations. *Human Biology.* 83(3): 345-361.
- Chang Y.M., Perumal R., Keat P.Y., Yong R.Y.Y., Kuehn D.L. and Burgoyne L. (2007). A distinct Y-STR haplotype for amelogenin negative males characterised by a large Yp11.2 (DYS458-MSY1-AMEL-Y) deletion. *Forensic Sci Int.* **166**: 115-120.
- Chang YM, Burgoyne LA, Both K. (2003). Higher failures of amelogenina sex test in an Indian population group. *J Forensic Sci.* **48**:1309-1313.
- Eastoe JE. (1965). The chemical composition of bone and teeth. *Adv Fluorine Res Dent Prevent* **3**: 5-17.
- Fincham, A.G., Bessem, C.C., Iau, E.C., Pavlova, Z., Shuler, C., Slavkin, H.C. and Snead, M.L. (1991). Human developing enamel proteins exhibit a sexlinked dimorphism. *Calcif. Tissue Int.* **48**: 288-290.

- Francés, F., Castelló, A. y Verdú, F. (2008). El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: Métodos y posibles fuentes de error. Cuad. Med. Forense. **15**(52): 119-125.
- Hans García-Moreno J, Mindell DP. (2000). Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs): a case study using avian CHD. MolBiolEvol. **17**(12):1826-32.
- Jasinska, A. and Krzyzosiak, W.J. (2004). Repetitive sequences that shape the human transcriptome. FEBS Letters. **567**: 136-141.
- Kashyap VK, Sahoo S, Sitalaximi T, Trivedi R. (2006). Deletions in the Y derived amelogenin gene fragment in the Indian population. BMC Med Genet. **7**: 37.
- Kao L., Tsai L., Lee J.C. and Hsieh H. (2007). Controversial cases of human gender identification by amelogenin test. Forensic Science J. **6**: 69-71.
- Lattanzi W *et al.* (2005). A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. Hum Genet. **116**:395-401.
- Lau, E.G., Mohandas, T.K., Shapiro, L.J., Slavkin, H.C. and Snead, M.I (1989). Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. Genomics **4**: 162-168.
- Mark, A. Jobling *et al.* (2007) Structural Variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. HumanMolecular Genetics.**16**(3): 307-316.

- Michael A. and Brauner P. (2004). Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. *J Forensic. Sci.* **49**: 258-259.
- Mitchell R.J., Kreskas M., Baxter E., Buffalino L. and Van Oorschot R.A.H. (2006). An investigation of sequence deletions of amelogenin (AMELY), a Y-chromosome locus commonly used for gender determination. *Annals Hum Biol.* **33**: 227-240.
- Mulligan C. G. et al. (1998), A Rapid Method of Haplotyping HFE Mutations and Linkage Disequilibrium in a Caucasoid Population. *Gut* **42**: 566-569.
- Nakahori, Y., Takenaka, O. and Nakagome, Y. (1991) A human XY homologous region encodes "amelogenin". *Genomics.* **9**: 264-269.
- Nakahori, Y., Hamano, K., Iwaya, M. and Nakagome Y. (1991). Sex identification by polymerase chain reaction using homologous primers. (1991). *Am. J. Med. Genet.* **39**: 472-473.
- Parkin E.J., Kraayenbrink T., Opgenort J.R.M.L., Van Driem G.L., Tuladhar N.M., De Knijff P. and Jobling M.A. (2007). Diversity of 26-locus Y-STR haplotypes in a Nepalese population sample: isolation and drift in the Himalayas. *Forensic Sci Int.* **166**: 176-181.
- Pollak-Eltz A. (1972). Vestigios Africanos en la Cultura del Pueblo Venezolano. Capítulo 2, Procedencia de los Esclavos Negros Traídos a Venezuela. Instituto de Investigaciones Históricas, Universidad Católica "Andrés Bello". pp. 23-33.
- Rodríguez-Larralde, A., D. Castro de Guerra, and J. Gonzalez Coira M y Morales. (2001). Frecuencia génica y porcentaje de mezcla en diferentes áreas geográficas de Venezuela, de acuerdo a los grupos Rh y ABO. *Interciencia* **26**: 8-12.

- Roffey PE, Eckhoff CI, Kuhl JL. (2000). A rare mutation in the amelogenina gene and its potential investigative ramifications. J Forensic Sci. **45**:1016- 1019.
- Salvador J., Molina C., Solórzano S., Cázarez S., Rendón H., Murillo J., Ríos J. (2008). Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina. Rev Mex Patol Clin, **55**: 17-20.
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. (1998). Reliability of DNA-based sex tests. Nat Genet. **18**:103.
- Shadrach B, Commane M, Hren C, Warshawsky I. (2004) A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. J Mol Diagn. **6**:401-405.
- Shimokawa, H., Ogata, Y., Sasaki, S., Sobel, M.E., Mc Quillan, C.T., Termine, J.D. and Young, M.F. (1987) Molecular cloning of bovine amelogenin cDNA. Adv. Dent. Res. **1**:293-297.
- Steinlechner M., Berger B., Niederstätter H. and Parson W. (2002). Rare failures in the amelogenin sex test. Int J Legal Med. **116**: 117-120.
- Sullivan, K.M., Mannucci, A., Kimpton, CP. and Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sextest - fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. Biotechniques **15**: 636-642.
- Takayama T., Takada N., Suzuki R., Nagaoka S., Watanabe Y., Kumagai R., Aoki Y. and Butler J.M. (2009). Determination of deleted regions from Yp11.2 of an amelogenin negative male. Legal Medicine. **11**: S578-S580.

- Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. (2002) Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int J Legal Med.* **116**: 121-123.
- Waye JS *et al* (1985) Chromosome-specific alpha satellite DNA: nucleotide sequence of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X chromosome. *Nucleic. Acids. Res.* **13**: 2731-2743.
- Welsh K. I. and Bunce M. (1999), Molecular Typing for the MHC with PCR-SSP. *Reviews in Immunogenetics* **1**:157-176.
- Witt M. (1989). A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Human Genetics.* **82**: 271-274.
- Wolfe J *et al.* (1985). Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J. Mol. Biol.* **182**: 477-485.
- Xueling Ou *et al* (2012). Null alleles of the X and Y chromosomal amelogenin gene in a Chinese population. *Int J Legal Med.* **126**:513–518.
- Yan Ma., Jin-Zhi Kuang., Ji Zhan., Gui-Min Wang., Yu-Jian Wang., Wei-Min Jin., Yi-Ping Hou., (2012). Y chromosome interstitial deletion induced Y-STR allele dropout in AMELY-negative individuals. *Int J Legal Med* **126**:713–724.

Electrónicas:

- Mapa de ligamiento del cromosoma X. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=X&MAPS>
(Consulta 15 de mayo 2014).
- Mapa de ligamiento del cromosoma Y. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=Y&MAPS>
(Consulta 15 de mayo 2014).
- Marcadores genéticos del CODIS
<http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis>
(Consulta 08 de diciembre 2013).
- Secuencia del gen AMEL, comparación de las copias en los cromosoma X y Y. Short Tandem Repeat DNA Internet Data Base,
<http://www.cstl.nist.gov/strbase/index.htm>
(Consulta 10 de septiembre 2014).

ANEXOS

Buffers y soluciones stock relacionados con extracción de ADN:

RCLB (Red Cell Lysis Buffer): 0,144 M cloruro de amonio (NH_4Cl) y 1 mM bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

Disolver 7,7 g de cloruro de amonio y 0,84 de bicarbonato de sodio en H_2O csp un litro.

NLB (Nuclear Lysis Buffer): 10 mM Tris, 0,4 M NaCl y 2 mM EDTA.

Disolver 23,37 g de NaCl en 900 ml de agua, añadir 10 mL de 1 M tris y 4 mL de 0,5 M EDTA. Añadir H_2O csp un litro.

NLB + SDS: mezclar 300 mL de NLB con 20 mL de SDS 10 %. Puede ocurrir que el SDS amanezca precipitado por el frío, incube el frasco con la solución a 56°C en baño de María por unos minutos hasta que redisuelva el SDS.

6 M NaCl: 35,064 g de NaCl en H_2O csp 100 mL.

0,5 M EDTA pH = 8: En 800 mL de H_2O estéril añada 186,1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$, mezcle con agitador magnético, ajuste el pH a 8 con NaOH (20 gramos de perlas aproximadamente). Añada H_2O csp un litro.

691 M tris pH = 7,6: En 800 mL de H_2O estéril añada 121.1 g de tris base. Ajuste el pH a 7,6 con 60 ml de HCL concentrado (37%). Añada H_2O csp un litro. Si quiere pH = 8 añada solo 40 mL de ácido.

Preparación del gel de Agarosa 1%

La calidad y cantidad del ADN obtenido se pondera de forma cualitativa corriendo 8 µl de la muestra en minigel de agarosa al 1 % en buffer TAE (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8,5) coloreado con bromuro de etidio: 0,4 g de agarosa en 40 ml buffer TAE 1X + 3 µl de bromuro de etidio.

Preparación gel de acrilamida 10 %:

Volumen final 14 mL. 5 mL de solución madre 30 % (proporción 29:1) + 9 ml buffer TAE 1X. 8 µl TEMED (se agrega de último ya que inicia polimerización) 68µl persulfato de amonio 15 %.

Coloración con nitrato de plata del gel acrilamida:

1. FIJACION: Sumergir el gel en solución fijadora por 10 minutos.
Lavar dos veces con agua destilada.
2. IMPREGNACIÓN: Sumergir el gel en la solución de impregnación (Nitrato de Plata al 0,15 %) x 10 min. Lavar levemente con agua destilada.
3. REVELADO: A 50 ml de una solución de Hidróxido de Sodio 1,5 % se añaden, minutos antes de usarla, 200 µl de Formaldehído.
Se cubre el gel agitando para evitar que el precipitado negro que se forma, manche el gel. Se deja revelar por 15 minutos.
4. Lave con abundante agua de chorro.

SOLUCIONES:

- a. **Fijador:** Etanol 10 % y ácido acético 0,5 % (100 mL de etanol, 5 mL ácido acético y agua csp un litro).
- b. **Impregnación:** 1,5 g de AgNO_3 en agua csp un litro. Reciclarla una o dos veces.
- c. **Revelador:** 1,5 % Hidróxido de Sodio (15 g de NaOH en agua csp un litro), a 50 mL se añaden 200 a 260 μL de Formaldehído 100 % poco antes de usarla).

Es importante utilizar un agua destilada de buena calidad, libre de cloro. El cloro produce un *background* negro que impide visualizar las bandas.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIO DE PATOLOGÍA MOLECULAR
CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
ESCUELA “LUÍS RAZETTI”

EXPLICACIÓN DE LA IMPORTANCIA DEL PROYECTO PARA EL DONANTE:

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

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

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

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

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

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



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIO DE PATOLOGÍA MOLECULAR
CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
ESCUELA “LUÍS RAZETTI”

Caracas 02/03/13

Carta de Información Autorización del Donante de Muestra para el Proyecto:

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

Yo, _____, Portador de la CI: _____ mayor de edad, declaro que; se me proporcionó una carta explicativa de los alcances del proyecto sobre el Estudio del gen AMELY y su importancia para el avance de los conocimientos del Acervo Genético de la Población Venezolana en beneficio de la población en general y las mejoras en el uso de marcadores genéticos para la identificación individual.

Leí la carta, entendí el planteamiento, entiendo que mi muestra de ADN será utilizada solo dentro del proyecto y para ningún otro fin y acepto donar una muestra de sangre para ello.

Firmo conforme:

CI:

