



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**Facultad de Ciencias Químicas
Lic. en Químico Farmacobiólogo**

**Fiscalía General del Estado de Puebla
Instituto de Ciencias Forenses
Laboratorio de Genética Forense.**

**VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DEL KIT INNOTYPER®21 EN EL
LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE DE LA FISCALÍA GENERAL DEL
ESTADO DE PUEBLA PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS FORENSES.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

**Que presenta, pQFB. Pilar Berenice Vargas
Aquino**

Directores de Tesis:

M.C. Florencia Bertoni Ruíz

Asesor de Tesis

I.B.Q. Roberto Quintana Vega

Asesor Técnico:

M.C. Patricia Guadalupe Suárez Albores

2. ÍNDICE

2. ÍNDICE

3. RESUMEN	4
4. INTRODUCCIÓN.	10
6. MARCO DE REFERENCIA	25
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
8. JUSTIFICACIÓN.	28
9. OBJETIVOS.	29
10. HIPÓTESIS.	30
11. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.	31
a) Tipo de estudio	31
b) Universo del estudio.	31
c) Tamaño de muestra.	31
d) Sede y lugar de estudio.	31
e) Criterios de selección	32
- Criterios de inclusión:	32
- Criterios de exclusión	32
f) Recursos humanos	32
g) Recursos financieros.	32
h) Diseño estadístico.	32
12. MATERIALES Y METODOLOGÍA	33
13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
14. CONCLUSIONES	55
15. BIBLIOGRAFÍA.	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de ADN en el genoma humano. (Castañeda M., 2013)	18
.	18
Tabla 2. Recursos humanos que participan en este proyecto.	32
Tabla 3. Preparación de la curva estándar	39
Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para cuantificación del control de ADN.	40
Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para amplificación por punto final del control de ADN.	41
Tabla 6. Condiciones de reacción para PCR por punto final.	41
Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción con el kit InnoTyper®21 para electroforesis capilar.	42
Tabla 8. Resultados de la cuantificación del control de ADN del kit InnoTyper®21.	46
Tabla 9. Cálculo de Fold Change del control de ADN del kit InnoTyper®21.	47
Tabla 10. Simbología de colores para perfiles genéticos.	48
Tabla 11. Perfiles genéticos obtenidos a partir de las diluciones del control de ADN del kit	48
Tabla 12. Cálculo del umbral estocástico del kit InnoTyper®21.	49
Tabla 13. Resultados de concentración y señal de fluorescencia en RFU del marcador ALU79712.	51
Tabla 14. Resultados de concentración y señal de fluorescencia del marcador NBC216.	52
Tabla 15. Cuadro de colores para perfiles genéticos de muestras control amplificadas a 31 ciclos.	53
	53
	53
Tabla 16. Cuadro de colores para perfiles genéticos de muestras control amplificadas a 29 ciclos.	53
Tabla 17. Cuadro de colores para perfiles genéticos de muestras control amplificadas a 27 ciclos.	53

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Diagrama de flujo para la preparación de la curva estándar del kit InnoQuant®HY-R.	34
Fig. 2. Diagrama de flujo para la cuantificación de la concentración de ADN en diluciones seriadas del control InnoTyper®21.	35
Fig. 3. Diagrama de flujo para la amplificación de diluciones del control positivo InnoTyper®21 en PCR de punto final.	36
Fig. 4. Diagrama de flujo para realizar el método de electroforesis capilar.	37
Fig. 5. Diagrama de flujo para realizar la prueba de especificidad de especies	38
Fig. 6. Análisis de la curva estándar para el kit InnoQuant®HY-R.	45
Fig. 7 Electroferogramas de las diferentes las diluciones del control del kit	50
Fig. 8 Gráfico de regresión lineal de la concentración vs señal de fluorescencia para el marcador ALU79712.	51
Fig. 9 Gráfico de regresión lineal de la concentración vs señal de fluorescencia para el marcador NBC216.	52

DEDICATORIA

A mis padres Máximo Vargas y Elizabeth Aquino: quizás no encuentre las palabras precisas para agradecer y honrar todos los sacrificios que han hecho para mí y esta oportunidad de la vida. Que la misma pues, me alcance para brindarles más logros como muestra de agradecimiento y amor infinito hacia ustedes.

Este logro es nuestro.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, pues todo se remonta desde mi creación y su acompañamiento para conmigo en cada una de las decisiones que he tomado y por darme la dicha de tener a mis padres que creyeron y confiaron en mí.

A quienes son un ejemplo de vida, de esfuerzo y dedicación desde mi infancia, mis hermanos David y Deissy, gracias por sus palabras tan acertadas en cada momento y a la familia de cada uno de ustedes por el aprecio y cariño que me demuestran ante su presencia.

Y ciertamente aprendemos de las lecciones, pero aún más de las personas, aquellas que han marcado parte de mi existir y por las que me mantengo en pie, pues recuerdo con clamor y expectativa las frases que me han fortalecido y aunque ya no están conmigo físicamente, viven en cada una de ellas: a mis tíos, Paco † y Memo †.

Este trabajo tuvo lugar en el laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla, cuyo espacio me brindó grandes conocimientos y que no hubiese sido posible sin la aportación del personal que labora en el área, mis agradecimientos infinitos a la M.C. Florencia Bertoni Ruiz y al I.B.Q. Roberto Quintana Vega principalmente, por su apoyo educativo, comprensión y sobre todo paciencia ante mi trabajo. Gracias por brindarme la oportunidad de elaborar esta tesis.

Fue muy grato contar con el apoyo de mi asesora de tesis, Maestra Patricia Suárez, admiro su labor y agradezco que me haya brindado sus conocimientos y consejos en cada etapa de este trabajo. Para quienes me mostraron bases de todo el conocimiento en algún momento y a quienes agradezco de manera especial por ello, además de su paciencia y comprensión, a las maestras que formaron parte de la comisión revisora: Ana Bertha, Claudy y María de la Cruz.

Finalmente agradezco también a Karen y Sarahí a quienes este trabajo de tesis me permitió conocer y que conservo como fieles amistades, por sus palabras que me indujeron a continuar y no desfallecer, su conocimiento y aportaciones.

Familiares y amigos que han contribuido con su apoyo moral e incondicional en este trayecto, gracias.

Nada en la vida hay que temer, solo hay que comprenderlo. Ahora es el momento de entender más, para que podamos temer menos.

Marie Curie.

GLOSARIO

ADN: Ácido Desoxirribonucleico, molécula que contiene la información genética.

Alelo: cada forma alternativa de un gen o fragmento que se encuentra en el mismo sitio de cromosomas homólogos.

Amplicón: fragmento de ADN producto de la amplificación.

Amplificación de ADN: copiar repetidamente una secuencia de ADN de forma in vitro.

Banda tartamuda: artefactos considerados como unidad de repetición de ADN menores a 4 pb que pueden ocasionar mala interpretación del perfil genético.

Polimorfismo bialélico: secuencia que presenta únicamente dos alelos posibles, uno ancestral y el otro derivado, consecuencia de un cambio en el primero.

Cebador: secuencia corta de ADN de cadena simple que actúa como iniciador en la reacción en cadena de la polimerasa.

Ciclo umbral: es el número de ciclo en que la fluorescencia sobrepasa el umbral, es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN.

Cromosoma: son estructuras de ADN que se encuentran en el interior del núcleo celular y contienen la información genética de los individuos.

Degradación de ADN: es la fragmentación o rompimiento de la cadena de ADN.

Delección: se considera como una mutación genética en donde hay pérdida de uno o más pares de nucleótidos.

Electroferograma: gráfica que representa los fragmentos de ADN amplificados en una PCR por medio de picos que determinan su tamaño y la fluorescencia que emiten.

Electroforesis capilar: método de separación de los fragmentos amplificados y detección de fluorescencia a través de un tubo capilar relleno de polímero.

Escalera alélica: fragmentos de ADN que contienen los alelos de los STRs de un perfil genético con los cuales se puede comparar los alelos de una persona.

Extracción de ADN: método por el cual se separa y purifica el ADN del material biológico para su análisis.

Fluorocromo: molécula que se utiliza para marcar fragmentos de ADN por su capacidad de emitir luz a una determinada longitud de onda.

Gen: secuencia de ADN dispuesto en orden fijo a lo largo de un cromosoma y, que contiene información para codificar proteínas.

Heterocigoto: cuando una persona posee un par de alelos diferentes en un gen o marcador determinado.

Inserción: es la mutación genética que involucra la adición de uno o más pares de nucleótidos.

Kit o sistema genético: es el conjunto de marcadores genéticos que pueden ser simultáneamente analizados.

Linaje: se define como la línea sucesoria de antepasados o sucesores familiares de un individuo.

Loci: se refiere a la posición o localización de un gen en un cromosoma.

Marcador genético: se define como un fragmento de ADN con características y ubicación conocida en un cromosoma.

Muestra de ADN: material biológico que contiene ADN y es apto para su análisis.

Multilocus: la combinación de alelos que se encuentran en dos o más loci.

PCR: (Reacción en Cadena de la Polimerasa – por sus siglas en inglés). Método para amplificar o reproducir un elevado número de copias de un fragmento a partir de una muestra de ADN.

Perfil genético: se trata de un patrón de secuencias de ADN que se encuentran ordenados de acuerdo a su tamaño y son características de cada individuo.

Pico: en un electroferograma representa un alelo y su altura depende de la concentración de ADN.

Polimorfismo genético: se refiere a una variante genética en la secuencia del ADN entre individuos de la misma especie.

Retrotransposones: son elementos genéticos que poseen la capacidad de amplificarse a sí mismos en un genoma.

Ruido de fondo: en un electroferograma se presentan como picos a lo largo de la línea de base, no reproducibles como consecuencia de fluctuaciones de corriente, burbujas de aire, o contaminación de la muestra, entre otros.

STR: (Secuencias Repetidas en Tándem – por sus siglas en inglés). Secuencias de ADN cuyo fragmento oscila entre 2 a 7 pb que se repite de forma consecutiva.

Umbral estocástico: parámetro medido en RFU que establece la altura mínima a la que todo pico de amplicón de un locus dado debe mostrar confianza y evitar interpretaciones inválidas cuando el producto de PCR es demasiado bajo.

Validación: es conocida como la confirmación a través de pruebas que evidencian que se cumplen los requisitos de uso de un método.

Verificación: se trata de evaluar el desempeño de un método y demostrar que su función cumple con los objetivos que fueron especificados como requisitos de validación.

3. RESUMEN

En el laboratorio de Genética Forense se presentan problemas al analizar muestras forenses expuestas a factores que inducen la degradación del ADN y complican la obtención de perfiles genéticos y posteriormente la identificación de personas. Actualmente se han diseñado cebadores a base de elementos retrotransponibles o INNUL: Alu, elementos de inserción – SINE (Elemento Nuclear Corto Intercalado) y LINE (Elemento Nuclear Largo Intercalado) alelos nulos. Con el kit InnoTyper®21, es posible obtener un perfil de ADN completo con 20 marcadores de elementos Alu y LINE de entre 60 a 125 pb, y Amelogenina para determinar sexo, a diferencia de los métodos convencionales que utilizan polimorfismos STRs (Repeticiones Cortas en Tándem).

En este trabajo se realizó la verificación y validación interna del kit para ello se prepararon 7 diluciones seriadas del ADN control, se amplificaron por el método de PCR de punto final siguiendo las condiciones del fabricante y se cuantificó la concentración a través del método de qPCR. La validación del kit en el laboratorio se realizó para definir el número de ciclos para amplificación de muestras hemáticas de controles impregnadas en papel FTA con el fin de optimizar tiempo y recursos materiales. La efectividad de ésta se comprobó mediante el método de electroforesis capilar, y se estimó un valor de concentración de ADN mínimo para obtener perfiles genéticos aceptables.

El método demostró la efectividad de uso del kit estudiado para el análisis de muestras forenses que presentan alta degradación o una mínima concentración de ADN y a consecuencia pudiera ser no perceptible en la amplificación mediante métodos convencionales y así, no obtenerse resultados u obtener resultados parciales, debido a esto el kit InnoTyper®21 pretende ser una herramienta complementaria de los métodos convencionales. Es decir, si se combinan resultados de ambos métodos y estos presentan características de análisis estadísticos que tiendan a obedecer las leyes Mendelianas requeridas en casos forenses, principalmente con fines de identificación humana.

4. INTRODUCCIÓN.

La ciencia ha evolucionado en las diferentes áreas y no menos importante en el ámbito forense en donde día a día se deben contribuir a esclarecer actos delictivos con los métodos que nos brinda la tecnología. Sin embargo, debemos tomar en consideración que el adecuar un método a un laboratorio como es en este caso el de genética forense, estos deben ser verificados o si es el caso validar dentro de este para evaluar su objetividad con el fin de brindar información verídica y de calidad.

Uno de los principales factores a los que se enfrentan los peritos en el análisis de muestras forenses como lo son; sangre, saliva, semen, huesos o raíces de cabellos entre otros, son la degradación del ADN que se encuentra en los indicios. Este factor es ocasionado por temperaturas extremas, humedad, agentes químicos, la exposición a microorganismos o a la radiación UV que a consecuencia la amplificación de ADN no es viable para su análisis pues la muestra puede encontrarse por encima del índice de degradación que limita la amplificación por estos métodos o como también puede ocurrir en muestras con concentraciones muy bajas de ADN.

Actualmente y debido a la importancia a tomar de estos dos factores se han diseñado kits para la extracción y amplificación de ADN especiales para las muestras que presenten tales condiciones, uno de ellos es el kit InnoTyper®21 que tiene como fundamento el uso de los elementos INNUL, estos elementos difieren entre poblaciones como entre individuos, a partir de estos elementos se crearon marcadores y con ello se logró completar un perfil genético, este diseño fue novedoso pues consiste en que los fragmentos de ADN a amplificar se reducen a ~60-125 pb, para que su utilidad sea de mayor impacto en muestras que han sufrido degradación debido a agentes físicos o agentes químicos y es para muestras de fragmentos óseos o cabellos sin raíz. (LaRue B.L. et al, 2012).

Con la verificación interna de este kit, se pretende utilizar como una herramienta complementaria para realizar el análisis de identificación de personas, casos criminales como delitos sexuales, muestras de dudosa procedencia que cuya característica principal presente degradación o una mínima concentración de ADN. Además de realizar la validación interna del método realizando ajustes de ciclaje para optimizar el tiempo y materiales principalmente, que no afecte obtener resultados aceptables para su análisis.

5. MARCO TEÓRICO

El desarrollo de la ciencia en la genética forense surge a partir del descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos ABO, hecho que realizó Landsteiner en 1901, sin embargo y debido al bajo grado de polimorfismos se descartó el sistema en otros estudios y se utilizó únicamente para casos de paternidad, más tarde es limitado pues investigadores se percataron de la predominancia de algunos tipos de sangre sobre otros y que podría excluir la paternidad de una persona con respecto a otra. En 1950 y siguiendo este hecho, se descubre el sistema HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) al observar las reacciones adversas que se presentaban durante las transfusiones sanguíneas y el rechazo en trasplantes de órganos. La prueba fue entonces complementaria a las existentes y a diferencia de estas, presentaba un mayor grado de polimorfismo. Este sistema se fundamenta en identificar a partir de técnicas serológicas, las variantes de proteínas expresadas en las membranas de los leucocitos. (Crespillo, M., et al., 2019).

Para fines de estudio en el campo forense se dio hasta el año de 1985 cuando Alecc Jeffreys *et al.* dan a conocer el método denominado como huella genética, gracias al descubrimiento de una secuencia repetitiva en una región no codificante del gen de la mioglobina. Esta técnica consistió en utilizar enzimas de restricción para clivar el ADN y para hibridar el ADN con una sonda complementaria mediante la técnica de Southern Blot y se obtuvo así un patrón de bandas múltiples loci con la misma secuencia dispersos en el genoma. Estas sondas fueron reconocidas como sondas multilocus o MPL's (Multilocus Probes) y así esta nueva técnica presentó un alto grado de polimorfismo al obtener un único patrón de bandas por cada individuo. Se denominaron VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) a las regiones repetitivas y a la técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). (Crespillo, M., et al., 2019).

A partir de entonces se diseñaron nuevas sondas que permitían identificar polimorfismos de ADN minisatelites en los cuales era posible observar dos bandas para una sola muestra que como ahora sabemos pertenecen a los alelos paterno y materno, estas sondas que hibridan en una única región del genoma son entonces denominadas unilocus o SLP (Single Locus Probes). Las desventajas que representaban este método fueron entre otros; el tiempo largo

de análisis, muestras con escasa concentración de ADN o con ADN degradado. (Crespillo, M., et al, 2019).

En el año de 1986 Mullis y colaboradores describen el método hoy conocido como Reacción en cadena de la polimerasa o PCR que consiste en la replicación in vivo del ADN sometándolo a diferentes temperaturas cíclicamente se lleva a cabo las etapas de desnaturalización-hibridación-elongación reproduciendo así exponencialmente cualquier región del genoma. Esta herramienta permitió que se analizaran muestras con pequeñas cantidades e incluirse en el análisis forense, pues como se sabe en este campo el contenido de material biológico puede ser ínfimo. (Crespillo, M., et al, 2019).

La primera vez que se utilizó la técnica de PCR en genética forense fue en el año de 1988 para identificar restos óseos de un caso en el cual se tomó para análisis el locus HLA-DQ alfa, sin embargo, pronto se descartó la idea debido al escaso poder de discriminación al presentar un bajo número de alelos. Los loci minisatelites estudiados hasta ese momento contenían alelos con fragmentos que oscilaban entre los 5-10 Kb, fragmentos muy grandes para el análisis por PCR y descartados para muestras degradadas. (Crespillo, M., et al, 2019).

En busca de minisatelites de menor tamaño se encontró al loci D1S80 con alelos de tamaño inferior a 1kb y se aplicó en los laboratorios forenses en 1990. Además de la amplificación del fragmento por PCR se detectaba al teñir con nitrato de plata y separar los fragmentos por la técnica de electroforesis capilar con gel de poliacrilamida. Desde aquel entonces se caracterizaron locus con unidades de repetición de entre 2 y 7 nucleótidos, más pequeños que los VNTR utilizados comúnmente que incluso el número de repeticiones es menor a estos y se les conoce ahora como microsátelites o repeticiones cortas en tándem STR (Short Tandem Repeats), a partir de ahí se establece su uso en identificación humana y con ello la evolución en las técnicas de análisis. (Crespillo, M., et al, 2019).

Esto derivó también el “sistema multiplex” que se refiere a la amplificación de varios STR de forma simultánea en una misma reacción, hecho que en sus inicios se realizaba por cada fragmento. También se diseñaron primers del gen de la amelogenina, este gen se encuentra en ambos cromosomas sexuales y a partir de este se determina el sexo de las muestras, la diferencia se observa en que el par de fragmentos amplificados se presenta una delección de

6 pb correspondiente al cromosoma Y en los hombres y/o un único fragmento que pertenece al cromosoma X en el caso de las mujeres. (Crespillo, M., et al, 2019).

Los sistemas de detección también sufrieron cambios, de manera que ahora estos son automatizados y se utilizan diferentes fluorocromos para marcar cada fragmento incluso diferenciar los que son de tamaño similar. El uso de los cromosomas autosómicos STR en la actualidad con fines de identificación humana tienen mayor auge por su cumplir su objetividad, además de demostrar factibilidad en la estandarización por los laboratorios que los utilizan y no menos importante la compatibilidad con equipos de detección de nueva generación. (Crespillo, M., et al, 2019).

Recientemente, se habla de estudios que involucran el ADN mitocondrial contenido como su nombre lo indica en las mitocondrias celulares, organelos que tienen la función de la producción de energía en forma de ATP debido a la fosforilación oxidativa que llevan a cabo y a diferencia del ADN nuclear se transmite únicamente por vía materna, por un patrón vertical no mendeliano. Sus características principales son el elevado número de copias (1000-10 000) que posee cada célula dependiendo del tejido del cual solo el 7% del total no codifica para proteínas y presenta una elevada tasa de polimorfismos que le confiere una variación significativa de secuencias entre especies e individuos. Es por ello que su principal aporte se encuentra en estudios filogenéticos hasta introducirlos en la genética forense como complemento en análisis de muestras que presentan degradación. (Solano, A., et al, 2001).

Los métodos que se utilizan para realizar los análisis que ayuden a resolver casos delictivos también han evolucionado por ello es importante tomar en cuenta que los indicios que se recolectan para el uso de este kit deben cumplir con las siguientes características, pueden ser; fragmentos de huesos o tallos de cabello sin raíz que presenten degradación de ADN. Un laboratorio de genética forense se encarga del estudio de la herencia biológica por medio de la variabilidad genética del ácido desoxirribonucleico, mismo que tiene como objetivos el estudio de las relaciones de parentesco entre individuos, identificación de personas desaparecidas e incluso la identificación de procedencia de un indicio biológico obtenida desde una escena de crimen. (Cano et al. 2006).

Este laboratorio cuenta con varios sistemas de identificación según sea el caso que se busca resolver; como sistemas de linajes con base en marcadores sexuales asociados con línea paterna y casos de abuso sexual, estudio de cromosoma Y relacionado a casos especiales de herencia biológica, sistemas de linaje en donde no están presentes alguno de los progenitores (hermanos, abuelos, padre-hija, etc.), finalmente los nuevos y novedosos sistemas de identificación humana en casos con pocas alternativas, estos incluyen marcadores para muestras altamente degradadas y/o en cantidad mínima crítica (Rodríguez et al., 2010).

Y todos los laboratorios independientemente de ser acreditados o deban cumplir su acreditación, deben realizar la validación o verificación de equipos y métodos según sea el caso, con el fin de brindar la confianza de los resultados del servicio que otorgan a sus clientes, para ello, se debe revisar la Norma Internacional ISO/IEC 17025:2017, Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo, Pero, ¿qué es validación y cuál es la diferencia entre verificación?

Esta Norma Internacional define en el apartado 5.4.5.1 como validación de métodos a la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. A diferencia de ésta, en la verificación se comprueba que el laboratorio que ya desarrolla el método confirma mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados (ISO/IEC-17025:2017).

5.1 NMX-EC-17025- IMNC-2018 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

En la Norma Mexicana aplicable en nuestro país NMX-EC-17025- IMNC-2018, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, la cual se desglosa a partir de la Norma Internacional encontramos señalados los requisitos mínimos para realizar la validación interna que se describen a continuación. (NMX-EC-17025-IMNC-2018).

- *Especificidad/selectividad*, este parámetro mide la capacidad para identificar el analito en presencia de otras sustancias o contaminantes de comportamiento similar en la misma muestra. (Guía Eurachem, 2016).

- *Exactitud (sesgo)*, se refiere a la cercanía del valor medido de concentración con respecto a un valor de referencia aceptado o teórico. Puede determinar el error total del procedimiento. (INCIFO Puebla, 2016).
- *Linealidad*, es la capacidad del método para emitir resultados que posean la proporcionalidad directa entre la concentración del analito en la muestra y la señal recibida. (INCIFO Puebla, 2016).
- *Sensibilidad*, mide la capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Evalúa la habilidad para obtener resultados confiables para un rango de cantidades de ADN, incluye límites superiores e inferiores del ensayo. (SWGDM, 2016).
- *Precisión*, expresa la medida de cuán cercanos se encuentran los resultados que se obtienen a partir de una serie de mediciones valores y/o resultados individuales de un material en condiciones específicas. La propagación de los resultados se calcula por una desviación estándar típicamente. (Guía Eurachem, 2016).
- *Repetibilidad*, refleja la precisión de un método estudiando su variabilidad en los resultados efectuados en una serie de mediciones sobre la misma muestra cuando las condiciones operativas las realiza el mismo analista, el mismo equipo y reactivos, en un mismo laboratorio y en un corto periodo de tiempo. Este parámetro supone la menor variación en los resultados. (Guía Eurachem, 2016).
- *Reproducibilidad*, es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra, sin embargo, las condiciones operativas las realizan diferentes analistas en diferentes días y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad a diferencia que este debe suponer mayor variabilidad entre las mediciones. (INCIFO Puebla, 2016).

Existen algunos conceptos a considerar para la validación de métodos cuando las mediciones que se llevan a cabo son en concentraciones muy bajas y así obtener un valor significativo del resultado del analito en cuestión que sea diferente a cero. Tales conceptos se enmarcan en los siguientes parámetros a analizar. (Guía Eurachem, 2016).

- *Límite de detección (LOD)*, es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada por el método y distinguirse del ruido de fondo ocasionado por el equipo

o interferencias ambientales que pueden alterar los resultados y disminuir el nivel de confianza especificado. (Guía Eurachem, 2016).

- *Límite de cuantificación (LOQ)*, es el nivel más bajo de concentración de analito que puede ser cuantificado desempeñando la función del método analizado. (Norma ISO/IEC 17020).

Para evaluar estos conceptos en el kit InnoTyper®21 es necesario entender conceptos básicos de la genética que engloban los pasos que se llevan a cabo para su uso en el laboratorio e involucran los métodos y técnicas de análisis.

5.2 Genética.

El ser humano posee la capacidad de ser único gracias a su constitución genética que le es heredada por sus antecesores y está contenida en el genoma. Esta diversidad genética ocurre en el ADN que no codifica para proteínas, es decir, ADN no codificante o no funcional que está presente en el núcleo de nuestras células pues a diferencia del ADN codificante, este último no difiere entre individuos. La unidad más pequeña que constituye a un organismo es la célula, su núcleo contiene el ADN (Ácido desoxirribonucleico) compactado en cromosomas. Los seres humanos poseemos 23 pares de ellos siendo cada cromosoma una copia heredada del padre y la otra de la madre, 22 de estos son denominados autosómicos y el restante es el que determina el sexo del individuo y puede ser X o Y; en hombres (XY) y en mujeres (XX). Cada cromosoma posee doble material genético (diploide) con excepción del par de cromosomas sexual que solo poseen material genético en proporción simple (haploide), sin embargo, en las mujeres el cromosoma sexual al ser XX se comporta como diploide. Los seres vivos tenemos los mismos caracteres que se manifiestan de modo que cada individuo se diferencia de otros, esto es posible gracias a la expresión de los genes y su variación, los cuales son segmentos de ADN alineados en los cromosomas y así, el lugar en donde se localiza se conoce como locus. Los genes ubicados en los cromosomas autosómicos se encuentran por duplicado, estas dos copias se denominan alelos y ocupan el mismo locus en cromosomas homólogos. (Bear et al, 2016).

5.3 Leyes de Mendel.

En la genética forense es imprescindible comprender primero la herencia mendeliana simple, ya que, por ser nosotros organismos diploides heredamos el 50% del material genético de nuestro padre y el otro 50% de nuestra madre, que se ven reflejados por cada

secuencia del genoma en el cual poseemos dos alelos para cada locus o marcador. (Piro, 2014).

La primera ley o ley de la uniformidad, demuestra que, al cruzar dos líneas puras, es decir, que cada uno presenta una característica en particular como el color de ojos o piel, en la primera generación F1 se manifestará la misma característica fenotípica de uno de ellos, el que posee alelos dominantes (AA), y se conocen como híbridos. (Bear et al., 2016).

Segunda Ley o segregación de caracteres, se realizó la cruce entre dos híbridos de la primera generación que definió como los alelos se reparten y segregan sin mezclarse entre sí en la ya conocida proporción 3:1 y dar lugar a la segunda generación F2, esto es, que 3 de ellos obtendrán los alelos (Aa) y uno manifestará los alelos de la línea pura de característica opuesta (Bear et al., 2016).

5.4 *Ácido Desoxirribonucleico (ADN)*.

El ácido desoxirribonucleico es una molécula que constituye la información genética de los organismos vivos, se encuentra dentro de los núcleos celulares principalmente y también en mitocondrias que son organelos citoplasmáticos encargadas de producir la energía que utiliza la célula. Como principal componente del genoma este, contiene la información para la producción de proteínas, así como de moléculas regulatorias y estructurales. Su estructura se conforma por una pentosa (desoxirribosa) además de ácido fosfórico y como componente principal los nucleótidos: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) que forman dos largas cadenas y constituyen así el código genético. (Bear et al., 2016).

La estructura helicoidal de la molécula de ADN descrita en 1953 por James Watson y Francis Crick, se conforma por dos cadenas lineales de polinucleótidos que adoptan formas helicoidales paralelas con giro a la derecha, dentro de estas cadenas se encuentran las bases unidas en pares complementarias, alcanzando así varios miles de millones de pares de bases de longitud en el núcleo celular (Piro, 2014).

De acuerdo a la función biológica que desempeñan, se conocen dos tipos de ADN:

Tabla 1. Tipos de ADN en el genoma humano. (Castañeda M., 2013)

Tipos de ADN.			
<ul style="list-style-type: none"> ● ADN Codificante. <p>Contenido en un 30% de genoma, su función es la expresión de un gen que codifica para síntesis de proteínas.</p>			
<ul style="list-style-type: none"> ● ADN No codificante <p>Representa un 70% del genoma, su función es desconocida o no tienen función alguna, altamente polimórfico y, por lo tanto, de interés para análisis de identificación humana.</p>	<p>ADN de copia única</p> <p>Se cree que actúa como un espaciador entre secuencias codificantes.</p>		
	<p>ADN de copia múltiple</p> <p>Secuencias de ADN que se repiten alta, moderada o mínimamente.</p>	<p>ADN repetido en tándem</p> <p>Secuencias consecutivas agrupadas en el genoma. Se diferencian por el número de pares de bases que lo constituyen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> o <i>ADN minisatélite.</i> o <i>ADN microsatélite.</i>
		<p>ADN repetido disperso</p> <p>Este grupo de secuencias repetidas se encuentran dispersas en el genoma.</p>	<ul style="list-style-type: none"> o <i>LINE</i> (Elementos nucleares intercalados largos). o <i>SINE</i> (Elementos nucleares intercalados cortos). o <i>Transposones.</i>

5.5 Polimorfismos de ADN.

Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de ADN que afectan al ADN no codificante. Estas regiones se han considerado objeto de interés en la identificación humana debido a la variación entre individuos como entre poblaciones. Se conocen diferentes tipos: (Armour et al., 1992).

5.5.1 STR

En la actualidad los sistemas utilizados para la identificación de personas implican los STRs (Short Tandem Repeats o repeticiones cortas en tándem) y como su nombre lo indican son secuencias compuestas por 2-7 pb repetidas en tándem de 3-50 veces. Estas secuencias están distribuidas en el genoma en longitudes menores a 400 pb y de ahí se obtienen los alelos que son conocidos por el número de veces que se repiten estas secuencias por ejemplo para un alelo 3 la secuencia GATC se repetirá tres veces (GATC, GATC, GATC), cabe mencionar que la nomenclatura (rango de alelos) de los STR puede variar entre los diferentes marcadores. Para los análisis de identificación como de parentesco se toman en cuenta criterios que los STR poseen y son; su elevado poder de discriminación, es decir, que la capacidad de los marcadores permita diferenciar genéticamente a individuos no relacionados tomados al azar, su heterocigosidad se refiere a la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomados al azar de una población sean diferentes, es de relevante importancia también la baja tasa de mutación principalmente en los casos de parentesco, ya que al ser analizados correctamente pueden evitarse falsas exclusiones y no menos importante el porcentaje bajo de bandas tartamudas que definen a los productos alélicos que se diferencian de los alelos reales hasta por una unidad de repetición. Así, un perfil genético de ADN es el genotipo para varios STR que forman un código que permite diferenciar a un individuo. (Villalobos, 2018)

5.5.2 Elementos de inserción o nulos (INNUL).

Tras varios años de estudio de los elementos transponibles en el genoma humano, se han identificado como secuencias de nucleótidos de ADN no codificante que tiene la capacidad de moverse en el genoma por medio del proceso de transposición inversa. Se ha comprobado que estos elementos presentan dos estados alélicos; elementos dispersos cortos (SINE) y elementos dispersos largos (LINE) que representan una inserción y un valor nulo

en el ADN respectivamente, es decir, que en un individuo dicha inserción puede estar presente o ausente en cada uno de los cromosomas homólogos. El mecanismo general para la transposición de estos elementos comienza cuando se transcribe a una molécula de ARN, este último sirve de molde para la síntesis del complemento de ADN, utilizando la enzima transcriptasa inversa, la nueva copia de LINE se inserta en el ADN del cromosoma de un nuevo sitio. (Hackenberg, 2005).

Se han denominado INNUL debido a los estados alélicos que presentan, y han sido elementos para estudios entre poblaciones, pruebas de paternidad y actualmente estudios de parentesco entre personas desaparecidas, por su baja tasa de mutación que los hace más estables que los STRs (Sinha et al., 2015).

Los elementos INNUL no tienen una función definida, sin embargo, se piensa que estas secuencias surgen de elementos de ARN cuyo complemento de ADN estaba disperso dentro del genoma como resultado de la actividad de la transcriptasa inversa. Está relacionado con las reordenaciones cromosómicas durante la evolución (Hackenberg, 2005).

5.6 Técnicas moleculares para el procesamiento de muestras en el laboratorio de genética forense:

5.6.1 Extracción de ADN.

El primer paso es obtener el ADN íntegro y puro de las células presentes en las muestras, esto se logra gracias a las características fisicoquímicas que presenta esta molécula, es decir, su carga negativa y su alta polaridad que le confiere sus grupos fosfato ayuda en la extracción tanto en la precipitación con soluciones acuosas y la adherencia con agentes inorgánicos de carga positiva para su purificación. En general este procedimiento tiene como base el siguiente fundamento: (Alejos L.P. et al, 2010)

1. Homogeneización del tejido. Ayuda a romper los enlaces entre células y prepararlas para su interacción con las soluciones del siguiente paso. (Alejos L.P. et al, 2010)
2. Lisis celular. Se liberan los ácidos nucleicos al destruir con detergentes y agentes caotrópicos la membrana celular y nuclear, además se añaden agentes que inhiben la activación de la DNAsas (enzimas que degradan el ADN). (Alejos L.P. et al, 2010)

3. Unión de ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas. Al añadir etanol a la solución anterior la capa hidratante del ADN se pierde y los grupos fosfato que le confieren carga negativa quedan expuestos para unirse a las partículas de sílice magnetizadas con carga positiva que le confiere una solución amortiguadora de pH ácido, entonces así, los lípidos y proteínas no afines a estas partículas serán desechadas con una solución de lavado. (Manual técnico Maxwell16, 2013)
4. Recuperación del ADN. Liberación del ADN con soluciones de lavado para deshacerse de los otros componentes celulares. (Alejos L.P. et al, 2010)
5. Elución de los ácidos nucleicos. Agregando una solución básica para neutralizar las cargas de las partículas y separar así del ADN. (Manual técnico Maxwell16, 2013)

5.6.2 Cuantificación de ADN y PCR en tiempo real.

Para el siguiente paso que es la amplificación del producto obtenido es necesario determinar el rendimiento de la muestra estimando la cantidad de ADN presente. Anteriormente este objetivo se lograba por la técnica de espectrofotometría pues el ADN también posee la característica de absorber la luz UV en concentraciones mínimas, sin embargo, no puede ser el caso en genética forense, pues en ocasiones la cantidad de muestra no es suficiente para realizar más ensayos y debido a esto se ha optado por cambiar esta técnica por cuantificación y amplificación de manera simultánea con la técnica de PCR en tiempo real. (Villalobos, 2017)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real tiene como objetivos principales la detección y cuantificación de ADN, el primero se refiere a que se detecta la amplificación por cada ciclo de la reacción emitiendo fluorescencia, y la cuantificación que es posible medir la cantidad de ADN presente en una muestra. Para la reacción se utilizan los mismos reactivos que una PCR de punto final y se añade un fluoróforo para identificar el producto amplificado. Se clasifican dos tipos de fluoróforos o reporteros fluorescentes: (Loftus et al, 2017).

- Los métodos no específicos son moléculas que tienen afinidad por el ADN de doble cadena que al ser oxidado emite una señal de fluorescencia. El SYBR Green, es un ejemplo, su función se fundamenta en que al ser una molécula cargada

positivamente emitirá fluorescencia al unirse a la doble cadena de ADN. (Loftus et al., 2017).

- El principio de los métodos específicos consiste en un donador fluorescente que transfiere energía a un aceptor, o “quencher” para emitir la señal. Las sondas Taqman, se constituyen de oligonucleótidos que contienen el donador fluorescente y el quencher, que permanecen unidos mientras la sonda no se hibride a la secuencia de interés, cuando esto ocurre, los componentes sufren cambios conformacionales que afectan la actividad exonucleasa de la enzima Taq polimerasa haciendo que se rompa la unión entre ellos y se libere la señal de fluorescencia contenida en el donador. (Loftus et al., 2017).

El Ct (ciclo umbral) se detecta en la fase exponencial de la reacción e indica el número de ciclo, en el cual, aumenta la intensidad de emisión de fluorescencia con respecto al ruido de fondo. Se mide el Ct para determinar la cuantificación de ADN presente (Cornejo et al., 2014).

5.6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Sistema Multiplex).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para obtener millones de copias de secuencias específicas de ADN, por acción de la enzima polimerasa que puede sintetizar naturalmente el ADN en conjunto con otros elementos necesarios para llevar a cabo la reacción; molde, como su nombre lo indica actúa como molde para copiar las nuevas cadenas, los primers son los que delimitan la secuencia que se va a copiar, los dNTPs (dinucleótidos trifosfatados) bases nitrogenadas con las que se formarán las nuevas cadenas de ADN, un cofactor enzimático que conduce a la especificidad de la reacción y solución amortiguadora. Estos elementos interactúan en las 3 etapas: (Tamay de Dios et al., 2013).

1. Comenzando con la desnaturalización, la cual consiste en la separación de las dos cadenas, rompiéndose así los enlaces de hidrógeno, las cadenas separadas se utilizan como templado para la etapa siguiente. (Cortazar et al., 2004).
2. Los primers se alinean en el extremo 3' del templado y se unen a la secuencia complementaria al disminuir la temperatura y las condiciones son aptas para la etapa de hibridación. (Cortazar et al., 2004).

3. En la etapa de extensión, la enzima polimerasa inserta los nucleótidos complementarios según sea el orden de la cadena molde, de 5' a 3', al igual que en la dirección de la síntesis del ADN. (Cortazar et al, 2004).

Existen- diferentes variantes de la PCR según lo que se desea investigar, en el laboratorio de genética forense se realiza como la Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex, esta técnica se define como la amplificación de dos o más fragmentos de interés en una misma reacción, se añaden un par de cebadores por cada secuencia a amplificar de un mismo tubo de reacción a diferencia de una PCR convencional también se incrementa la concentración de magnesio y de la polimerasa que se indican en los protocolos de los kits de amplificación y posteriormente el termociclador se encargará de ajustar automáticamente la temperatura en los tres pasos que conforman un ciclo (desnaturalización-alineación-extensión). (Bolívar, A.M. et al, 2013)

Esta técnica presenta como principal ventaja el reducido tiempo de procesamiento, además de los reactivos y materiales, no obstante, también se presentan dificultades en el momento en que se diseñan los cebadores pues todos deben presentar características fisicoquímicas similares para evitar errores durante la reacción, además de que es muy importante tomar en cuenta la manipulación correcta en las diferentes áreas para evitar contaminar las muestras y obtener resultados erróneos. (Bolívar, A.M. et al, 2013)

5.6.4 Electroforesis capilar.

Después de la amplificación de los marcadores o fragmentos de interés se continúa con la separación por tamaños de los mismos a través de tubos capilares de diámetro menor a 50 μm , esta técnica se logra de igual forma gracias a la característica química del ADN, recordemos que los grupos fosfatos poseen carga negativa; al ser puestos en un campo eléctrico aplicando voltaje estos van a migrar del electrodo negativo o cátodo al electrodo positivo o ánodo según la longitud del fragmento siendo los de menor peso molecular los que migran más rápido. Se selecciona el polímero de acuerdo a la cantidad de muestras a procesar, éste brinda el soporte para la separación de los fragmentos. Se añade también una solución de EDTA con el fin de establecer el campo eléctrico. (Magaña, J. et al, 2009)

El fundamento de la coloración de los fragmentos está dado por la presencia de fluoróforos unidos a los cebadores son detectados por un láser de argón presente en el equipo que emite

la señal a diferentes longitudes de onda y son detectados por el software adicionado para realizar el análisis finalmente. Las ventajas que presenta esta técnica es su capacidad para separar varios fragmentos a la vez, reducción de costos y tiempo. Por otro lado, las desventajas que puede acarrear en el límite de detección si se trabaja con concentraciones insuficiente de ADN o que presente una excesiva degradación. Para ello se debe tomar a consideración los siguientes lineamientos: (Buttler, J.M., et al, 2004)

5.6.4.1 Umbral analítico.

El umbral analítico es la medida en RFUs (Unidades de Fluorescencia Relativa) detectada por electroforesis capilar que determina el laboratorio para asegurar que en ese valor o por encima de el se diferencié un pico que pertenece a un alelo verdadero de un pico ocasionado por el ruido de fondo (Crespillo et al., 2012).

5.6.4.2 Umbral estocástico.

El término de umbral estocástico se refiere a la medición de los efectos que ocasionan desbalance o pérdida de alelos, por lo general, se debe a la baja cantidad de ADN presente en una muestra. Establece la altura mínima de pico en RFU a la que todo pico de amplicón de un locus dado debe mostrar confianza (Crespillo et al., 2012).

6. MARCO DE REFERENCIA

En el 2012 LaRue *et al* iniciaron una nueva estrategia de amplificación utilizando elementos retrotransponibles presentes en el ADN en una mayor proporción, el objetivo principal fue el estudio de la variación en la población, al utilizar esta estrategia, observaron que los elementos INNUL podían ser utilizados como marcadores en estudios de variación genética de la población más susceptible a limitaciones de técnicas de PCR, lo que dio paso a sentar las bases para desarrollar un panel múltiple de marcadores INNUL de amplicones cortos para la identificación humana en muestras forenses antiguas o degradadas (LaRue *et al*, 2012).

Fue en el año 2013 que se llevó a cabo el estudio que utilizaría marcadores Alu, InnoTyper™16, con 15 marcadores Alu y amelogenina, únicamente para muestras altamente degradadas. El proceso fue el siguiente: la amplificación de los dos alelos se produce a través de un cebador directo común sin marcar y dos cebadores inversos marcados con fluorescencia. El cebador inverso marcado para el alelo nulo se superpone al sitio de inserción del elemento retrotransponible, y el cebador inverso marcado para el alelo de inserción tiene una región que se superpone con la unión y el propio elemento, o justo dentro del elemento retrotransponible. Se realizó también una comparación entre los ensayos que utilizan mini-STR y Alu, obteniéndose una menor longitud en estos últimos, la degradación en muestras se llevó a cabo por sonicación en ambos casos y especificidad con diferentes especies (Sinha *et al*, 2013).

En el año 2016 Lowther *et al* realizaron un estudio validación del kit InnoQuant™ el kit InnoTyper™21 para cuantificar y determinar la degradación de ADN en muestras forenses, en el cual, se obtuvieron parámetros de sensibilidad, reproducibilidad y precisión. Además, se determinó la sensibilidad de los kits en presencia de mezclas de ADN, se utilizaron diferentes muestras forenses (cabello, sangre, semen, hueso, hisopos bucales) para evaluar la degradación y cuantificar la concentración mínima reportable (Lowther *et al*, 2016)

Recientemente (2019) en el Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla se realizaron validaciones de diferentes kits comerciales para la obtención de perfiles de ADN para la identificación humana, se determinó la sensibilidad de cada uno para posteriormente comparar entre ellos su eficiencia ante muestras degradadas que se

mantienen como rezago, con el kit Global Filer se obtienen perfiles reportables con una concentración mínima de 1 ng/ μ L, mientras que el kit PowerPlex Fusion 6C los perfiles reportables son visibles hasta una concentración de 0.0037 ng/ μ L, sin embargo, estos métodos se realizan a través de STR's, los cuales son fragmentos con mayor número de pares de bases en comparación con los mini- cebadores utilizados con el kit InnoTyper21. (George y Rodríguez, 2019).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Desde todos los tiempos, los crímenes se han considerado un reto para investigadores del área forense para poder esclarecer los actos delictivos desde el lugar de los hechos hasta llegar a los tribunales, y actualmente no es la excepción, puesto que, todo inicia en la recolección de evidencias ya que no siempre se obtienen las muestras ideales para obtener perfiles de ADN los cuales son necesarios para diferenciarlos de los perfiles de las víctimas o en su caso familiares, así como para identificar a personas desaparecidas o no localizadas.

En el laboratorio de genética forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla se presentan casos en los cuales se dificulta el análisis de las muestras forenses, esto debido a que han estado expuestas a factores ambientales como temperaturas extremas, humedad, rayos UV, sustancias químicas que degradan el ADN y, por lo tanto, la probabilidad de obtener un perfil completo mediante métodos convencionales, es baja o nula. Los métodos convencionales utilizan marcadores de polimorfismos STRs (Secuencias Repetidas en Tándem) secuencias mayores a 300 pb, que son específicos para la identificación humana, sin embargo, aún son inapropiados para muestras que presentan una cantidad muy baja de ADN o de mala calidad, esto deriva en secuencias incompletas que no pueden ser amplificadas.

Además, es posible encontrar muestras de ADN de buena calidad, pero en baja cantidad, y de forma inversa de mala calidad y alta cantidad, por lo que se requiere establecer un estándar de concentración aceptable para la amplificación de este tipo de muestras y lograr obtener un perfil útil para la identificación.

Los métodos que serán utilizados en el laboratorio deben comprobar su efectividad por medio de pruebas estandarizadas, esto con el fin de evaluar la veracidad para obtener resultados confiables y que cumpla con el objetivo para el que está elaborado.

Finalmente, esto nos lleva a cuestionar ¿Será posible que el kit InnoTyper®21 cumpla con los estándares indicados por el laboratorio de genética forense y demuestre ser idóneo para resolver casos difíciles de identificación humana?

8. JUSTIFICACIÓN.

Se han diseñado kits especiales para el tratamiento y análisis de muestras altamente degradadas que utilizan kit InnoTyper®21, los cuales, pueden proporcionarnos perfiles de ADN completos por medio de elementos INNUL presentes en mayor porcentaje en el genoma humano e idénticos solo por descendencia, por ello, se hace más específica la identificación al tratarse de una sola raza, se disminuye la probabilidad de confrontar con individuos de diferentes razas.

En este estudio se evalúa la eficiencia del kit InnoTyper®21, que, a diferencia de los convencionales, contiene 20 marcadores INNUL y Amelogenina, específico para determinar sexo. Los marcadores INNUL son elementos retrotransponibles que presentan dos estados alélicos; un alelo nulo o Alu, usualmente SINE (Elemento Nuclear Corto Intercalado) y un elemento de inserción o LINE (Elemento Nuclear Largo intercalado) con una diferencia de 200 a 400 pb mayor que los Alu. El kit no presenta el tamaño real de los INNUL, sino que se ha diseñado una nueva estrategia para reducir el tamaño de los amplicones, esto es, un primer o Mini-cebador que en su lugar amplifica secuencias de 60-125 pb, estas secuencias cortas presentan mayor sensibilidad para el estudio de un perfil completo en muestras dañadas, es compatible con equipos más sofisticados como el de PCR en tiempo real, el cual, nos brinda el análisis de la concentración de ADN presente en la muestra y equipos de electroforesis que nos proporcionan las lecturas de los electroferogramas, para obtener un perfil completo mediante las secuencias INNUL de las muestras y que sea un análisis confiable en cuyo caso no es posible obtenerlo con los ensayos utilizados actualmente en el laboratorio que utilizan STRs, fragmentos más largos y con menos probabilidad de ser amplificados por estos métodos.

9. OBJETIVOS.

General:

Realizar la validación y verificación interna de los parámetros de PCR de punto final del kit InnoTyper®21 en el laboratorio de genética forense en cumplimiento reglamentario de la NMX EC. 17025-IMNC-2018, para su uso en muestras forenses difíciles de analizar.

Específicos:

- Verificar la sensibilidad del kit InnoTyper®21 en muestras de ADN en fase acuosa, siguiendo las condiciones del fabricante.
- Validar la sensibilidad del kit InnoTyper®21 en muestras hemáticas fijadas en papel FTA, realizando modificaciones en el número de ciclos de amplificación.
- Determinar la sensibilidad del kit InnoTyper®21 utilizando muestras control que han sido cuantificadas previamente con el kit InnoQuant®HY-R para PCR en tiempo real.
- Obtener el umbral estocástico para el kit InnoTyper®21
- Hacer una comparación entre los ensayos propuestos con las condiciones establecidas por el fabricante y los resultados experimentales.
- Evaluar que se logra obtener resultados genéticos con el kit InnoTyper®21 en concentraciones inferiores a 1 ng/μL de ADN, obtenidos por los kits utilizados actualmente en el laboratorio.

10. HIPÓTESIS.

- **Hipótesis nula:** El kit InnoTyper®21 no cumple con los estándares de calidad establecidos por el laboratorio de Genética Forense para su validación y verificación interna, por lo tanto, no se llevará a cabo la elaboración de un protocolo para su uso en muestras forenses altamente degradadas.
- **Hipótesis alternativa:** El kit InnoTyper®21 cumple con los estándares de calidad establecidos por el laboratorio de Genética Forense para su validación y verificación interna, por lo tanto, es posible su uso para el análisis de muestras forenses altamente degradadas.

11. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

a) Tipo de estudio

- Se realizó un *estudio experimental*, ya que para la verificación interna se requieren pruebas estandarizadas que comprueben la objetividad del kit comercial para su verificación interna.
- En el *estudio cuantitativo* se determinó la sensibilidad del kit para amplificar una mínima concentración de ADN que usualmente contienen las muestras degradadas, por lo que se realizó la medición de la concentración a la cual es detectable en los equipos y así mismo su viabilidad para deducir un perfil genético.
- El kit también se validó internamente y mediante muestras hemáticas de controles impregnadas en papel FTA puesto que en algunos casos la calidad en este tipo de muestra es baja., para ello, se realizó un *estudio cualitativo* realizando comparaciones entre diferente número de ciclos a los que se amplificaron las muestras utilizando el mismo kit.

b) Universo del estudio.

- Control estándar del kit InnoTyper®21.
- Muestra hemática animal: *Canis lupus familiaris*.
- Muestra de tejido vegetal: *Crassula ovata*.
- Cepa: *Escherichia coli*.

a) Tamaño de muestra.

- 7 diluciones del control estándar del kit InnoTyper®21, (por triplicado)
- 3 Muestras control en papel FTA (por triplicado)
- 1 muestra hemática animal en papel FTA (por triplicado)
- 1 muestra de tejido vegetal en papel FTA (por triplicado)
- 1 colonia de cepa *E. coli* (por triplicado)

b) Sede y lugar de estudio.

- Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla.

c) Criterios de selección

- Criterios de inclusión:

- Diluciones de la muestra control positivo que proporciona el kit InnoTyper®21.
- Muestras hemáticas control en papel FTA resguardadas en el laboratorio.
- Muestra de hemática de mamífero no primate, muestra de tejido vegetal y muestra de cepa bacteriana.

- Criterios de exclusión

- d)** No se admitió otro tipo de muestras.

e) Recursos humanos

Tabla 2. Recursos humanos que participan en este proyecto.

M.C. Florencia Bertoni Ruíz	Líder Técnico en el Laboratorio de Genética Forense
I.B.Q. Roberto Quintana Vega	Perito en Genética Forense
M.C. Patricia Guadalupe Suárez Albores	Docente de la Facultad de Ciencias Químicas - BUAP
Pilar Berenice Vargas Aquino	Estudiante de la Facultad de Ciencias Químicas – BUAP

a) Recursos financieros.

El proyecto se llevó a cabo con recursos otorgados por el laboratorio de genética forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla, que se incorporará como uno de los procedimientos validados conforme al sistema de calidad en la que actualmente está acreditado NMX EC. 17025-IMNC-2018.

b) Diseño estadístico.

Determinación de los siguientes parámetros:

- Validación
- Linealidad
- Sensibilidad
- Robustez
- Precisión
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Umbral estocástico

12. MATERIALES Y METODOLOGÍA

- Tubos Eppendorf 1.5 μ L
- Tarjetas FTA
- Micro Punch Whatman Harris
- Kit InnoTyper®21
- Kit InnoQuant®HY-R
- Buffer Tris/EDTA
- Maxwell®16
- Nanofotómetro Implen P360
- Stratagene MX3005P
- Micropipetas (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L)
- Placas y Tapas ópticas Agilent
- GeneAmp PCR System 9700
- Genetic Analyzer 3500
- Software GeneMapper X
- Muestra hemática animal: *Canis lupus familiaris*
- Muestra de tejido vegetal: *Crassula ovata*
- Cepa bacteriana: *Escherichia coli*

Metodología

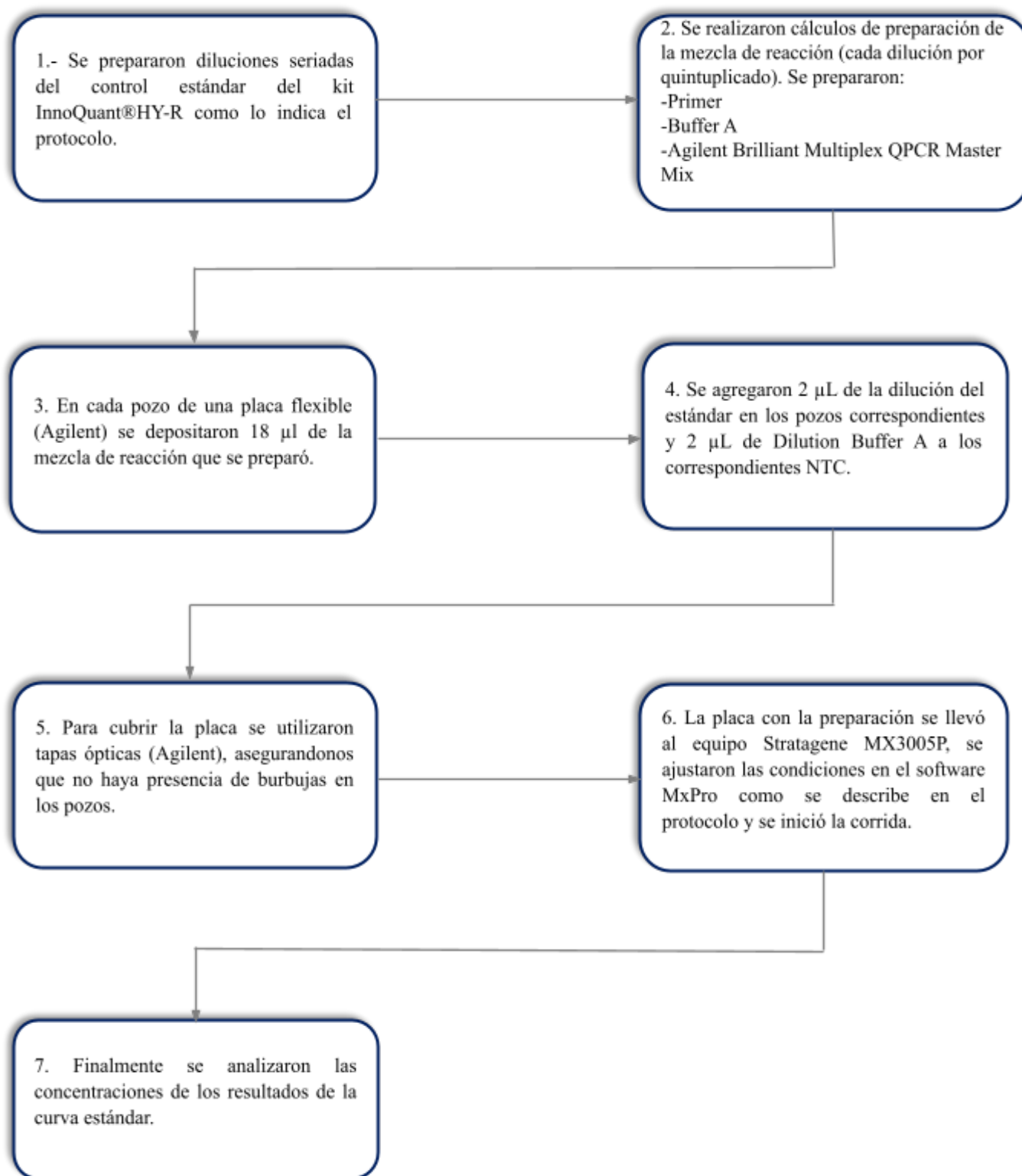


Fig. 1. Diagrama de flujo para la preparación de la curva estándar del kit InnoQuant®HY-R.

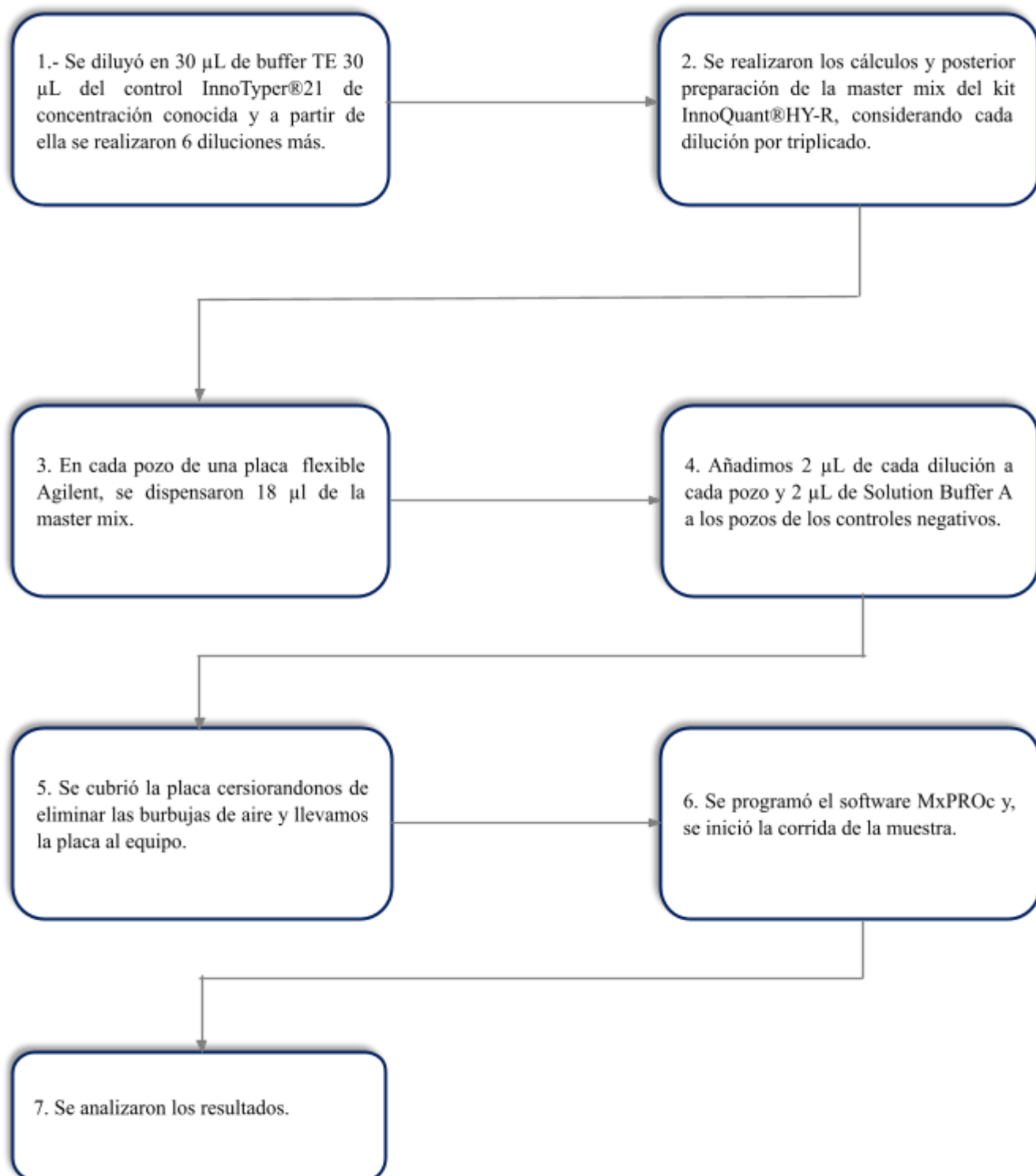


Fig. 2. Diagrama de flujo para la cuantificación de la concentración de ADN en diluciones seriadas del control InnoTyper®21.

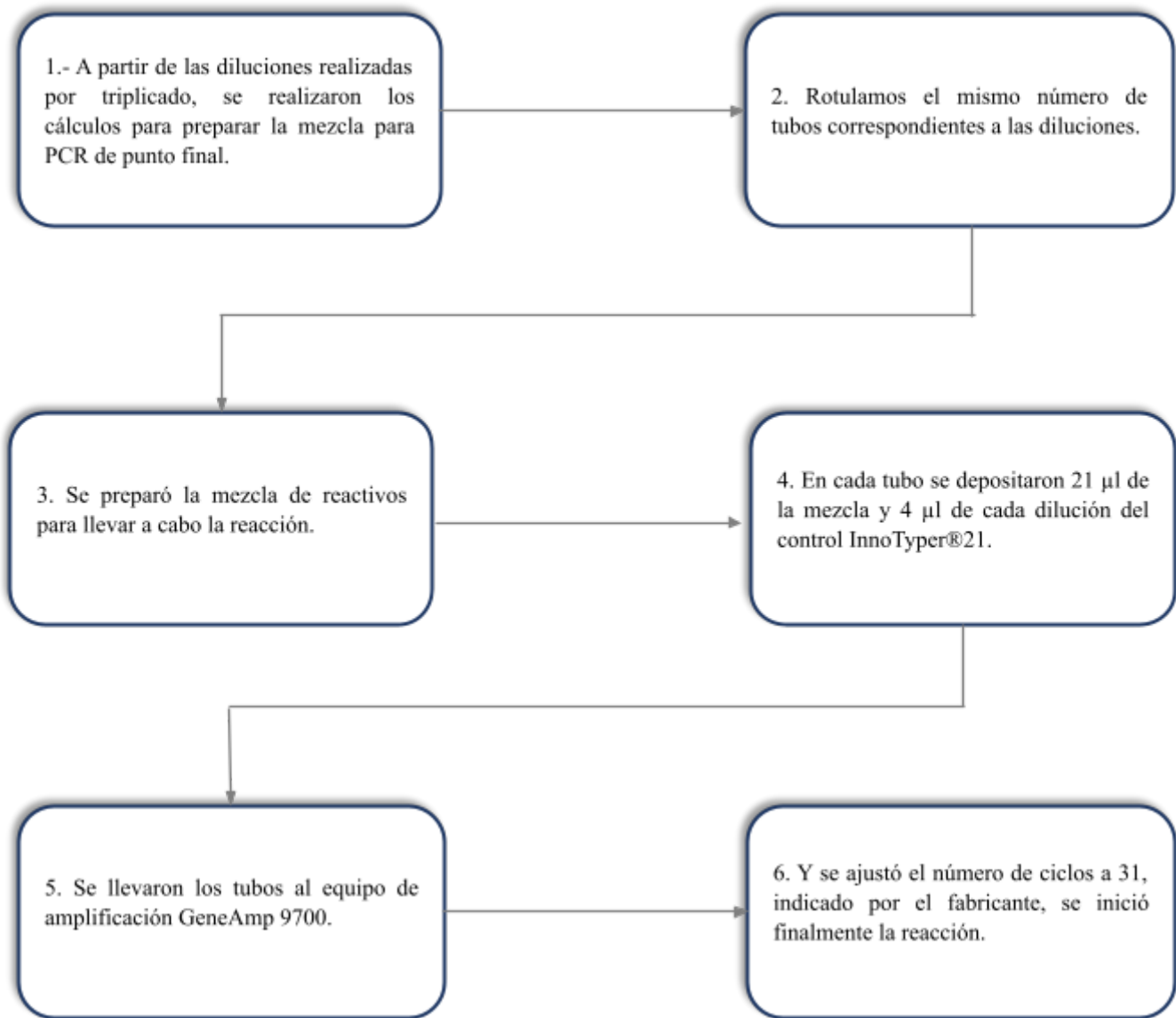


Fig. 3. Diagrama de flujo para la amplificación de diluciones del control positivo InnoTyper®21 en PCR de punto final.

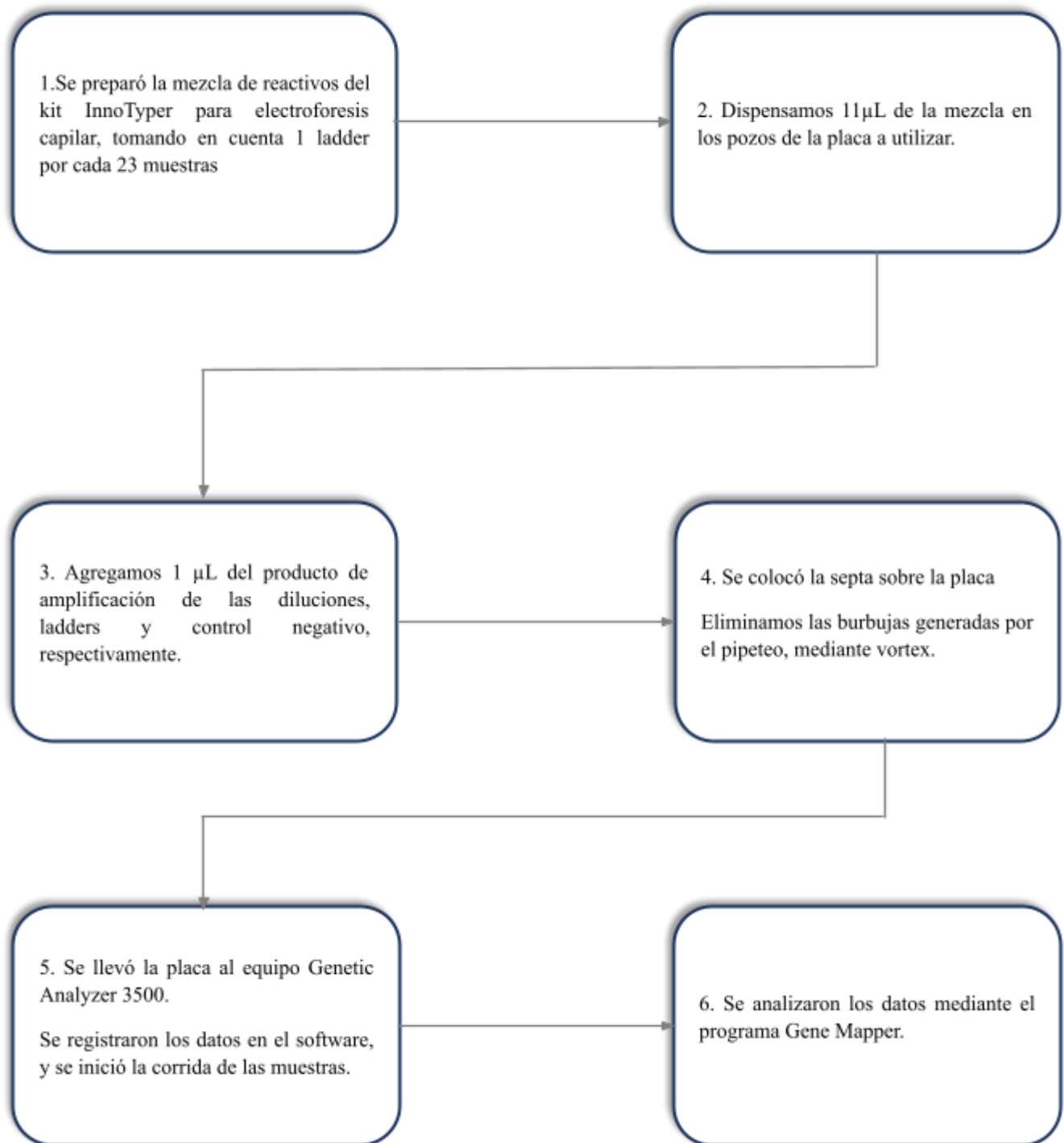


Fig. 4. Diagrama de flujo para realizar el método de electroforesis capilar.

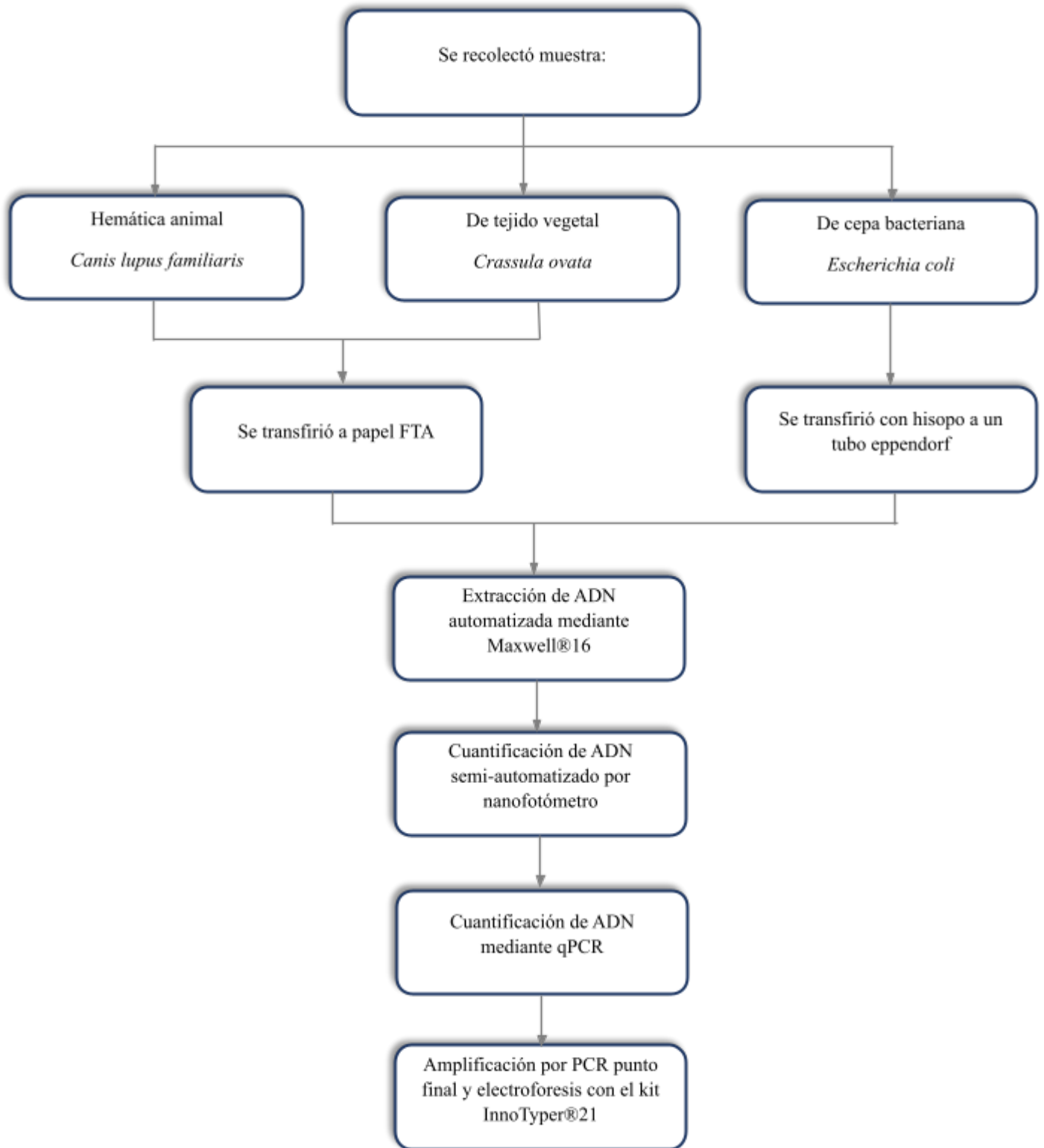


Figura 5. Diagrama de flujo para realizar la prueba de especificidad de especies.

Preparación de la curva estándar

1. Se atemperó el ADN estándar (100 ng/ μ L) durante 15 minutos y se homogenizó en el vortex por 5 minutos.
2. Se prepararon las diluciones seriadas del ADN estándar, para ellos se utilizó el reactivo InnoQuant Dilution Buffer A como se indica en la tabla 2.

Tabla 3. Preparación de la curva estándar

Estándar	Concentración ng/ μ L	Cantidad de dilución recomendada	Factor de dilución
Std.1	20	10 μ L [ADN 100 ng/ μ L] + 40 μ l de Dilution Buffer A.	5X
Std.2	2.5	10 μ L [Std.1] + 70 μ l de Dilution Buffer A.	8x
Std.3	0.3125	10 μ L [Std.2] + 70 μ l de Dilution Buffer A.	8x
Std.4	0.0391	10 μ L [Std.3] + 70 μ l de Dilution Buffer A.	8x
Std.5	0.005	10 μ L [Std.4] + 70 μ l de Dilution Buffer A.	8x

Nota: se hizo el cambio de puntilla entre cada dilución, antes de pasar el volumen se homogeneizó en el vortex por 5 segundos el tubo que contenía la dilución.

Preparación de la mezcla de reacción y placa.

1. Se atemperaron los reactivos; Primer, Dilution Buffer A y Agilent Brilliant Multiplex QPCR Master Mix, por 15 minutos antes de su uso y se tuvo cuidado de exponerlos a luz directamente.
2. Se homogeneizaron mediante vortex los reactivos de 3-5 segundos.
3. Se hizo el cálculo para realizar la mezcla de reacción de la curva estándar (cada dilución por quintuplicado), incluimos controles negativos y dos reacciones más por error de pipeteo.
4. Fue llenada la hoja de trabajo con los datos correspondientes a las diluciones y reactivos utilizados.
5. Se preparó la mezcla de reacción conforme se indica en la tabla 3.

Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para cuantificación del control de ADN.

Componentes de PCR	Volumen por reacción
Agilent Brilliant Multiplex QPCR Master Mix	10 μ L
InnoQuant HY-R Primer Mix	8 μ L
Volumen total	18.0 μ L

6. En una placa flexible (Agilent) se depositaron 18 μ L de la mezcla de reacción en cada pozo. Se agregaron 2 μ L de la dilución estándar en los correspondientes pozos y 2 μ L de Dilution Buffer A a los destinados para NTC.
7. Posteriormente se cubrió la placa con las tapas ópticas (Agilent).
8. Antes de llevar la placa al equipo nos cercioramos de que la placa se encontrará libre de burbujas de aire en los pozos antes de llevarse al equipo.
9. Se programó en el software del equipo las condiciones de corrida indicadas en el protocolo.
10. Se verificaron los parámetros de ciclaje en el equipo para amplificación en:
 - Tiempo y temperatura inicial: 10 min a 95°C
 - Seguido de 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C
 - 2 minutos a 61°C

Cuantificación del control InnoTyper®21

1. Se prepararon 7 diluciones seriadas del control de concentración conocida inicial 0.12 ng/ μ L hasta 0.001875 ng/ μ L en buffer TE.
2. Fue llenada la hoja de trabajo de QPCR.
3. Se realizaron cálculos para la preparación de la mezcla de reacción como se indicó en la preparación de la curva estándar, se llevó a cabo por triplicado cada dilución.
4. En la placa flexible (Agilent), se dispensaron 18 μ L de la mezcla de reacción en los pozos correspondientes.
5. Antes de llevar al equipo se eliminaron las burbujas de aire por vortex con mayor cuidado, y se cubrió la placa con precaución.
6. Se llevó al equipo de QPCR. Programamos el software conforme a las condiciones del fabricante.
7. Finalmente, se realizó el análisis de los datos.

Amplificación por PCR punto final del control InnoTyper®21

1. Se utilizaron las mismas diluciones del control que se prepararon en el procedimiento anterior.
2. Fueron llenadas las hojas de trabajo de amplificación por PCR punto final necesarias.
3. Los tubos para PCR fueron rotulados previamente.
4. Se preparó la mezcla de reacción del kit InnoTyper®21 indicado en la tabla 4, antes se consideró por triplicado cada dilución para realizar los cálculos.

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para amplificación por punto final del control de ADN.

PCR Componentes para Multiplex	Volumen por reacción 25 µl Total Mezcla de reacción
InnoTyper® Primer Mix	3.5 µL
InnoTyper® Master Mix	5.0 µL
IGT DNA polymerase	0.5 µL
DNA Template/Pos. Control/TE ⁴ buffer+	12 µL

5. Se dispensaron 21 µL de la mezcla de reacción en los tubos
6. Se agregó 4 µL de las diluciones del control.
7. En el tubo correspondiente al control negativo, se dispensaron 16 µL de buffer TE y 9 µL de control negativo del kit.
8. Nos cercioramos de cerrar los tubos con cuidado para evitar derrame y llevamos después al termociclador. Las condiciones de reacción se programaron como se menciona en la tabla 5.

Tabla 6. Condiciones de reacción para PCR por punto final.

Incubación inicial	31 Ciclos			Extensión final	Hold final
	Desnaturalización	Alineación	Extensión		
HOLD	CYCLE			HOLD	HOLD
95°C 15 min	95°C 30 sec	58°C 30 sec	72°C 1 min	60°C 60 min	4°C ∞

Electroforesis capilar

1. Primero, se llenó la hoja de trabajo de electroforesis capilar.
2. Se preparó la mezcla de reacción tomando en cuenta 1 ladder por cada 23 muestras.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción con el kit InnoTyper®21 para electroforesis capilar.

Reactivo	Volumen por reacción
Hi-Di™ Formamide	10.8 µL
ILS-155 Internal Lane Standard	0.2 µL*

3. Se dispensaron 11 µL de la mezcla de reacción en cada pozo de una placa para electroforesis capilar.
4. Se añadió 1 µL del producto de amplificación de las diluciones y control negativo.
5. Se agregó 1 µL de ladder (llevando a cabo en campana de extracción).
6. Con una septa flexible se cubrió la placa.
7. Las burbujas ocasionadas por el pipeteo fueron eliminadas mediante vortex.
8. Los datos de la hoja de trabajo se pasaron en la plataforma de programa, se realizaron los ajustes para iniciar la corrida en el equipo de electroforesis.
9. Se realizó el análisis de los resultados por GeneMapper.

Especificidad de especie

1. Se obtuvo muestra hemática de animal *Canis lupus familiaris* en un tubo vacutainer con EDTA, unas gotas de muestra fueron depositadas en tarjeta FTA, la cual se dejó secar a temperatura ambiente.
2. Se recolectaron pétalos de la planta *Crassula ovata*, se trituraron en mortero y se depositó el extracto que se obtuvo en papel FTA.
3. La cepa de *Escherichia coli* fue donada por la facultad de ciencias químicas de la BUAP y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.
4. Realizamos 3 recortes circulares de las muestras en papel FTA y se depositaron en tubos eppendorf previamente rotulados.
5. De la cepa bacteriana, se depositaron 3 colonias con un hisopo estéril, en un tubo eppendorf.

Extracción de ADN de las muestras de especies

1. Se llenó la hoja de trabajo para extracción automatizada en Maxwell®16 LEV
2. Fueron rotulados los tubos, se consideró realizar cada muestra por triplicado.
3. Se agregó a las muestras la solución de buffer de incubación/proteinasa K/DTT.
4. Se mezclaron e incubaron las muestras a $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 min.
5. Se colocó en la bandeja del equipo los cartuchos a utilizar con el lado de la etiqueta en dirección opuesta a los tubos de elución, cerciorarse de que el cartucho encaje correctamente.
6. Se retiró el sello de los cartuchos con cuidado.
7. Se colocó el extracto de la digestión en el pocillo 1, y el émbolo LEV en el pocillo número 8 de cada cartucho, el más alejado del tubo de elución
8. Fueron colocados los tubos de elución en la parte delantera de la bandeja, se agregaron 50 μL de buffer de elución en la parte inferior de cada tubo de elución.
9. Se ajustaron las condiciones correspondientes del equipo.
10. Colocamos la bandeja Maxwell®16 Cartridge Rack con los cartuchos dentro de la plataforma del equipo.
11. Finalmente, se inició la corrida.

Cuantificación de ADN de las muestras de especies por nanofotometría.

1. Como requerimiento para evitar la contaminación limpié y descontaminé el equipo Nanofotómetro Implen P360 y demás materiales antes de procesar las muestras.
2. Se ajustaron las condiciones del equipo.
3. Se realizaron tres mediciones por cada muestra de 3 volúmenes diferentes.
4. Se hizo limpieza de la celda para cada medición y cambiar puntillas.
5. Se elaboró una tabla para anotar los resultados que se obtuvieron del equipo.

q-PCR

1. Se preparó la mezcla de reacción del kit InnoQuant tal como se indicó en el procedimiento para la curva estándar. Tomando en cuenta cada muestra de extracción por triplicado y para NTC.

2. Se dispensaron 18 μL de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa flexible Agilent.
3. Añadimos 2 μL de muestra o Dilution Buffer A en el pozo correspondiente a NTC.
4. Fueron cubiertas las columnas de la placa con las tapas ópticas Agilent.
5. Antes de llevar al equipo eliminamos las burbujas de aire ocasionada por pipeteo mediante vortex.
6. Se llevó la placa al equipo y se ajustaron las condiciones de la reacción para iniciar el proceso.
7. Al terminar la corrida los resultados fueron analizados.

Amplificación por PCR punto final con el kit InnoTyper®21 de muestras de especies

1. Se rotuló el número de tubos a utilizar, considerado blanco de extracción y control negativo.
2. Preparé la mezcla de reacción del kit InnoTyper®21, como se indicó para el control del kit.
3. Dispensé 21 μL de la mezcla en cada tubo y adicioné 4 μL de la muestra o blanco de extracción. Para el control negativo se dispensaron 16 μL de buffer TE y 9 μL de control negativo.
4. Los tubos fueron llevados al termociclador, hallé las condiciones para el kit e inicié la reacción en el equipo GeneAmp 9700.

Electroforesis capilar

Se llevó a cabo el mismo proceso de preparación que el indicado para el control del kit.

13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva estándar

Mediante la curva estándar se evaluó la eficiencia del método, el fabricante del kit InnoQuant®HY-R hace referencia que a un coeficiente de determinación R^2 mayor a 0.985 y un porcentaje de eficiencia entre 90% – 110% indican que la amplificación y cuantificación por el método de PCR en tiempo real representan la precisión de los resultados detectados por el equipo y procesados con el kit. En la figura 6 se muestran los resultados arrojados para la representación de la curva estándar, en el recuadro se aprecian los resultados de los fluoróforos por cada fragmento en donde se observan valores de R^2 y eficiencia dentro de los límites establecidos.

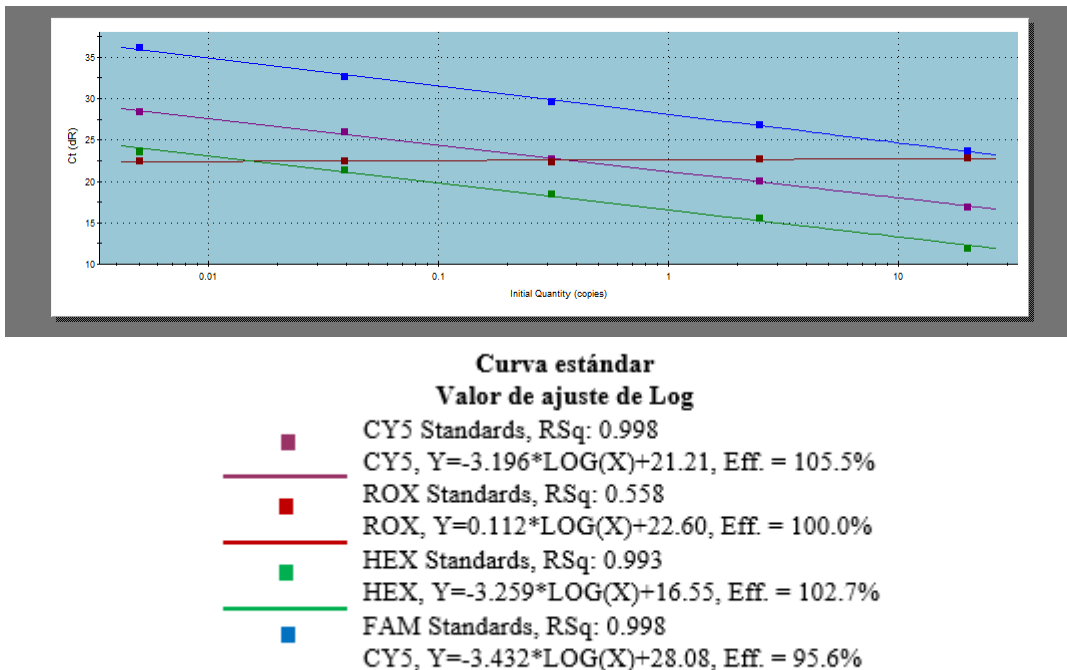


Fig. 6. Gráfica de ciclo umbral (Ct) con respecto a la concentración inicial de ADN para el análisis de la curva estándar para el kit InnoQuant®HY-R.

Cuantificación del Control de ADN del kit.

En función de la necesidad de obtener perfiles completos para muestras altamente degradadas el laboratorio evaluó la sensibilidad del kit para obtener perfiles a mínimas cantidades de ADN presentes en la muestra, por lo tanto, se realizaron diluciones para disminuir la concentración del control, la cual, se señala en el protocolo utilizado por el fabricante, a partir de ello se comparan los valores establecidos con los que se obtuvieron experimentalmente. En primera instancia, se realizó un promedio de los cinco valores detectados por el equipo, los cuales se plasman en la tabla 7.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación del control de ADN del kit InnoTyper®21.

CY5						
Dilución 1	Dilución 2	Dilución 3	Dilución 4	Dilución 5	Dilución 6	Dilución 7
0.12	0.037802	0.016812	0.0103274	0.005053	0.0024504	0.00130098

Fold change.

El cálculo de *fold change* nos permite evaluar la variación entre el valor que se obtuvo experimentalmente y el valor esperado (Ver tabla 8). Por lo tanto, se demuestra la cercanía de los valores teóricos mencionados en el protocolo y los que se obtuvieron al realizar el método con los equipos y materiales propios del laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía. El parámetro también puede evaluarse por la cercanía a un valor 1 del promedio de *fold change*, esto es, mientras más cercano sea el valor, se obtiene una sensibilidad mayor del equipo al realizar la determinación de concentración de ADN. En la tabla 8 se observa que el promedio se encuentra cercano a 1, y significa que presenta una variación poco marcada al comparar los resultados teóricos con los experimentales. Por lo tanto, la cuantificación puede llevarse a cabo en el equipo, puesto que proporciona una sensibilidad alta de medición.

Tabla 9. Cálculo de Fold Change del control de ADN del kit InnoTyper®21.

Control (+) InnoTyper®21	CY5		HEX		FAM	
	Concentración experimental ng/μL	Fold change	Concentración experimental ng/μL	Fold change	Concentración experimental ng/μL	Fold change
0.12000	0.12000	1.00000	0.12000	1.00000	0.12000	1.00000
0.06000	0.03355	0.55917	0.04108	0.68467	0.03382	0.56367
0.03000	0.01681	0.56040	0.01728	0.57600	0.01705	0.56847
0.01500	0.00917	0.61157	0.00976	0.65077	0.00859	0.57279
0.00750	0.00461	0.61520	0.00493	0.65763	0.00472	0.62875
0.00375	0.00245	0.65344	0.00259	0.69040	0.00246	0.65701
0.00188	0.00130	0.69386	0.00128	0.68406	0.00125	0.66925
0.00094	0.00050	0.53534	0.00061	0.65348	0.00025	0.26667
Promedio		0.65362		0.69963		0.61583

Sensibilidad

Se demostró la sensibilidad del kit al realizar las diluciones del control disminuyendo concentración, comprobando así que es posible obtener resultados en la amplificación aún por debajo de la concentración 0.12 ng/ μ L propuesta por el fabricante (ver simbología de colores, tabla 9), se realizó el análisis de los marcadores por electroforesis capilar (tabla 10), donde se muestra la concentración del control previamente cuantificado y los perfiles genéticos reportables se encuentran visibles con una concentración de 0.015 ng/ μ L en donde se observa desbalance entre los alelos, sin embargo, no es mayor al 60% establecido por el laboratorio y causado por posibles efectos estocásticos. Es decir, que para la concentración baja de ADN del kit se obtuvieron perfiles genéticos del control de ADN sin pérdida de alelos que invalidaran el perfil, como se aprecia, las columnas coloreadas en verde indican que los marcadores poseen tanto los alelos nulos como los de inserción según sea el locus. Esta cualidad se pierde en la concentración 0.0075 ng/ μ L cuyo valor de concentración incluso, es más bajo que los que se obtienen con métodos convencionales.

Tabla 10. Simbología de colores para perfiles genéticos.






SIMBOLOGÍA	
	Alelos presentes
	Desbalance entre alelos
	Pérdida alélica
	Sin presencia de alelos
	Presencia de más de dos alelos

Tabla 11. Perfiles genéticos obtenidos a partir de las diluciones del control de ADN del kit

		INNOTYPER 31 CICLOS - 25 µL																							
Concentración real	Concentración teórica	Dilución	AC4027	MLS26	ALU79712	NBC216	NBC106	RG148	NBC13	AC2265	MLS09	AC1141	TARBP	AMEL	AC2305	HS4.69	NBC51	ACA1766	NBC120	NBC10	NBC102	SBI9.12	NBC148		
			I	I,N	N	I	I,N	I,N	N	I,N	I,N	I	I,N	X,Y	I,N	I,N	N	I,N	I,N	N	N	I,N	I		
0.12	0.12ng/µL	D 0.1																							
		D 0.2																							
		D 0.3																							
0.037802	0.06 ng/µL	D 1.1																							
		D 1.2									50.51%														
		D 1.3									45.15%			51.47%											
0.016812	0.03 ng/µL	D 2.1																							
		D 2.2									57.23%			58.62%											
		D 2.3		42.83%					42.16%					39.99%											
0.0103274	0.015 ng/µL	D 3.1					47.13%							57.80%	59.03%	52.73%									
		D 3.2		56.50%							47.97%			23.36%	40.41%	53.49%			44.20%	45.91%					
		D 3.3		40.90%			33.04%	53.64%											52.97%						
0.005053	0.0075 ng/µL	D 4.1		46.14%						59.20%	318				42.30%	57.21%							203		
		D 4.2		204									350			54.99%									
		D 4.3					226	203				545				463				247					
0.0024504	0.00375 ng/µL	D 5.1		401									450	278									288		
		D 5.2									203			326										211	
		D 5.3		221				225				217					213		210						
0.00130098	0.001875 ng/µL	D 6.1								209															
		D 6.2																							
		D 6.3													197		377								
0.00050188	0.0009375 ng/µL	D 7.1																							
		D 7.2																							
		D 7.3																							

Umbral estocástico

A partir de los valores obtenidos por electroforesis capilar del producto de la amplificación de los diferentes marcadores se realizó el cálculo del umbral estocástico que se muestra en la tabla 11, así el resultado 582.146 es el valor en RFU por encima del cual es confiable admitir que el efecto no se debe a una pérdida alélica, sino que la presencia de un solo alelo puede ser resultado de un genotipo homocigoto cuando las concentraciones de ADN son mínimas. Para ello, por cada electroferograma se tomó en cuenta la señal emitida en RFU por marcador heterocigoto con pérdida alélica, se calcula el promedio para el conjunto de datos y se suma tres veces la desviación estándar. El valor UE calculado es el límite que indicará cuando existe una pérdida de alelos en heterocigosis si se obtiene un resultado menor a este.

Tabla 12. Cálculo del umbral estocástico del kit InnoTyper®21.

PCR 25 µl - RFU	
204	450
401	326
221	278
226	197
225	463
203	213
217	377
209	210
318	247
545	203
203	288
350	211
PROMEDIO	282.7083333
DESVIACIÓN ESTÁNDAR	99.81264151
UMBRAL ESTOCÁSTICO	582.1462579

Precisión

En la siguiente figura se observan los resultados para los marcadores AC2305 y HS4.69, los cuales demuestran que aún a concentraciones menores la amplificación de los elementos de inserción y nulos se encuentran en el locus correspondiente, por lo tanto, se comprueba que los resultados obtenidos experimentalmente en este proyecto concuerdan con el electroferograma del control de ADN validado por el fabricante.

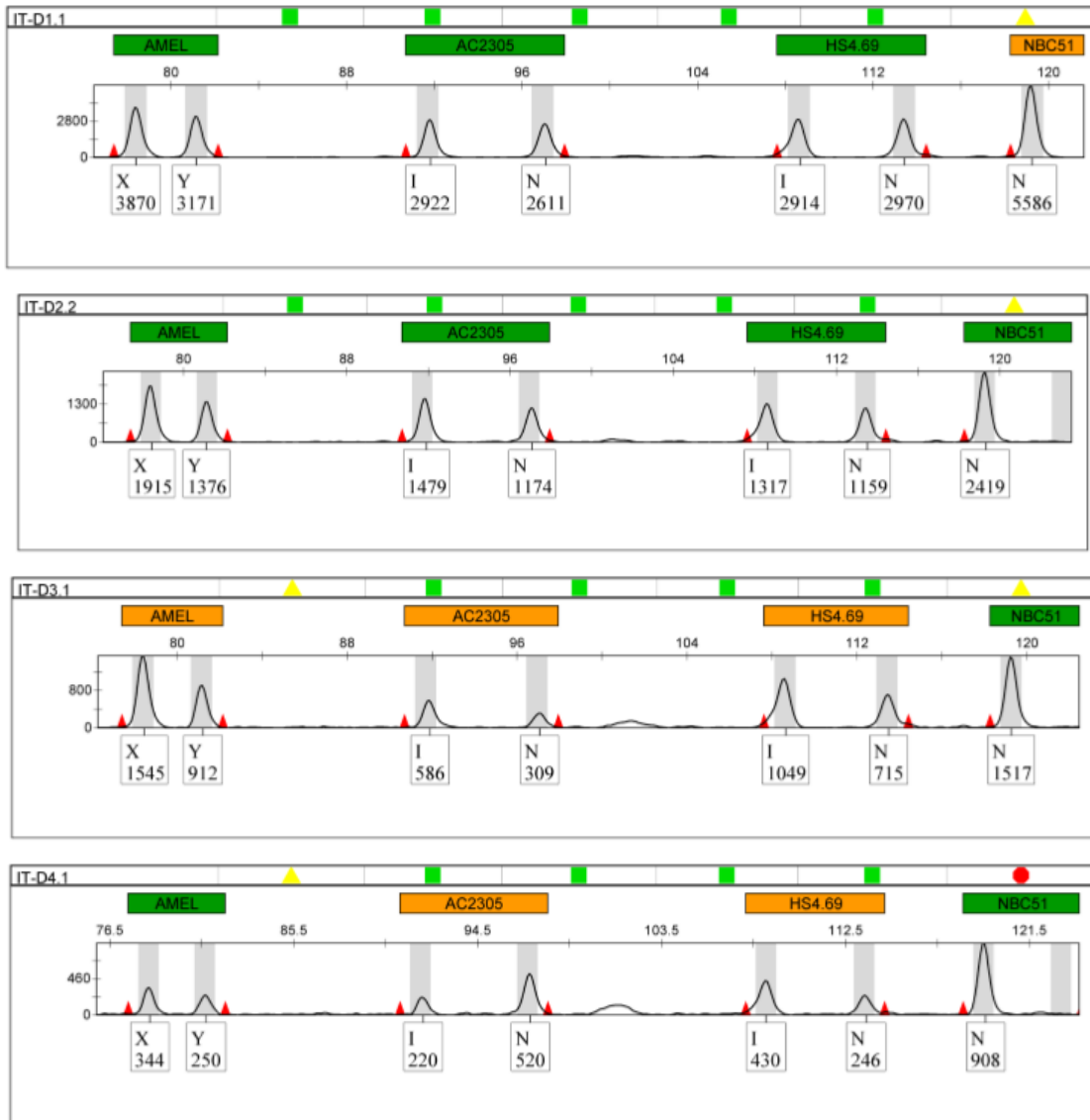


Fig. 7 Electroferogramas de las diferentes diluciones del control del kit

Linealidad

Para este parámetro a analizar se tomaron al azar dos marcadores de los electroferogramas que corresponden a las diluciones y se evaluaron por medio de regresión lineal, graficando la concentración del control vs la señal emitida en RFU, considerando estos se deduce la proporcionalidad directa que existe entre estas variables, así mismo, se confirma por el coeficiente de correlación cercano a 1.

Tabla 13. Resultados de concentración y señal de fluorescencia en RFU del marcador ALU79712.

ALU79712	
Concentración ng/ μ L	RFU
0.06	4758
0.03	2130
0.015	1201
0.0075	502
0.00375	181

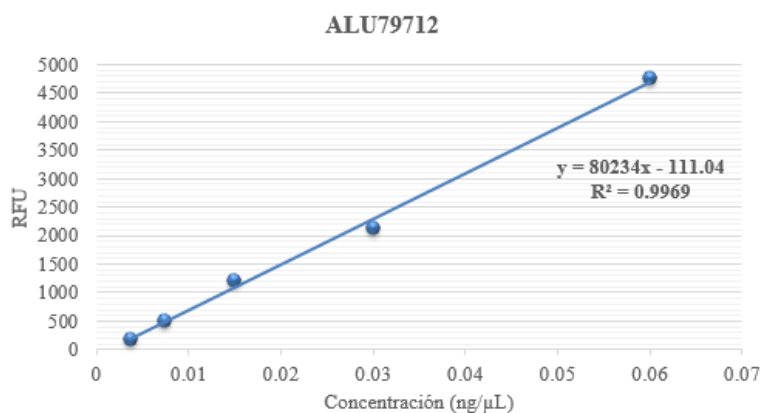


Fig. 8 Gráfico de regresión lineal de la concentración vs señal de fluorescencia para el marcador ALU79712.

En el siguiente marcador NBC216 los resultados indicados en la tabla 13 confirman que la concentración es directamente proporcional con la señal que se emite (Fig. 8), es decir, a mayor cantidad de ADN mayor será la señal de fluorescencia que reciba el equipo independientemente del marcador.

Tabla 14. Resultados de concentración y señal de fluorescencia del marcador NBC216.

NBC216	
Concentración ng/μL	RFU
0.06	7991
0.03	3133
0.015	1803
0.0075	997
0.00375	588

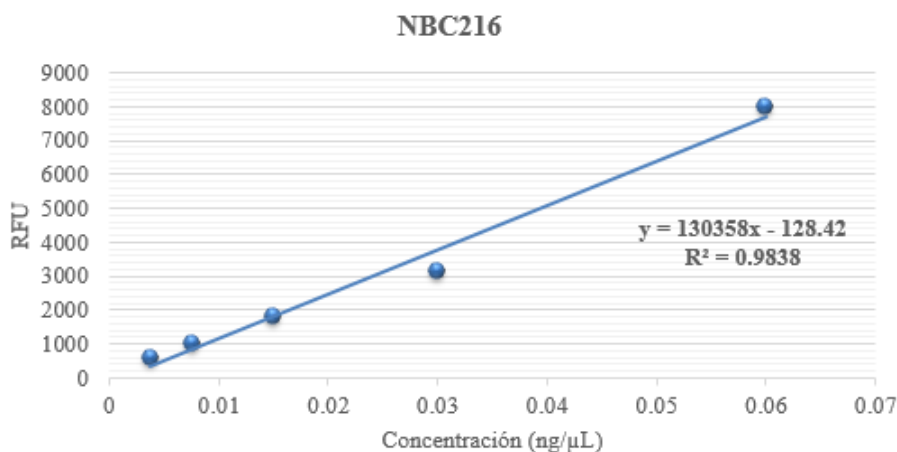


Fig. 9 Gráfico de regresión lineal de la concentración vs señal de fluorescencia para el marcador NBC216.

Repetibilidad

Para la estimación de este parámetro se efectuó el procedimiento en repetidas ocasiones y lapsos cortos de tiempo, no hubo variación significativa entre los resultados, es decir, se conserva la precisión del método.

Reproducibilidad

La reproducibilidad del método fue efectuada al realizar el mismo procedimiento, pero en diferentes fechas, siendo operados por diferentes analistas, sin embargo, al evaluar los resultados se confirmó la presencia de variaciones no significativas que afecten la precisión del método.

Validación en muestras impregnadas en papel FTA.

En las tablas 14, 15 y 16 se muestra la comparación entre los perfiles genéticos de muestras hemáticas control amplificadas con variación en el número de ciclos, esto se realizó con el fin de validar el método a un menor número de ciclos para optimizar tanto el tiempo como la concentración del kit, es decir, entre menor sea el número de ciclos de los que se obtengan perfiles reportables menor será la cantidad de reactivos que pueda utilizarse y mayor será el rendimiento sin causar alteraciones.

Tabla 15. Cuadro de colores para perfiles genéticos de muestras control amplificadas a 31 ciclos.

INNOTYPER 21, 31 CICLOS																						
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																						
	AC4027	MLS26	ALU7971	NCB216	NBC106	RG148	NBC13	AC2265	MLS09	AC1141	TARBP	AMEL	AC2305	HS4.69	NBC51	ACA1766	NBC120	NBC10	NBC102	SB19.12	NBC148	
	N	I,N	I,N	N	N	I,N	I,N	I	I,N	I	I,N	X,Y	I,N	I,N	N,I	I	N	I,N	N,I	I,N	I	
A1																						
A2																						
A3																						
A4																						
A5																						

Tabla 16. Cuadro de colores para perfiles genéticos de muestras control amplificadas a 29 ciclos.

INNOTYPER 21, 29 CICLOS																						
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																						
	AC4027	MLS26	ALU7971	NCB216	NBC106	RG148	NBC13	AC2265	MLS09	AC1141	TARBP	AMEL	AC2305	HS4.69	NBC51	ACA1766	NBC120	NBC10	NBC102	SB19.12	NBC148	
	N	I,N	I,N	N	N	I,N	I,N	I	I,N	I	I,N	X,Y	I,N	I,N	N,I	I	N	I,N	N,I	I,N	I	
N1																						
N2																						
N3																						
N4																						
N5																						

Tabla 17. Cuadro de colores para perfiles genéticos de muestras control amplificadas a 27 ciclos.

INNOTYPER 21, 27 CICLOS																						
PCR VOLUMEN TOTAL 25 µL																						
	AC4027	MLS26	ALU7971	NCB216	NBC106	RG148	NBC13	AC2265	MLS09	AC1141	TARBP	AMEL	AC2305	HS4.69	NBC51	ACA1766	NBC120	NBC10	NBC102	SB19.12	NBC148	
	N	I,N	I,N	N	N	I,N	I,N	I	I,N	I	I,N	X,Y	I,N	I,N	N,I	I	N	I,N	N,I	I,N	I	
R1																						
R2																						
R3																						
R4																						
R5																						

Especificidad

El kit tiene la capacidad de discriminar el ADN de otras especies, este parámetro fue evaluado al realizar el mismo procedimiento de amplificación de ADN de diferentes especies y al analizar los electroferogramas que se obtuvieron, no se observó la amplificación de los alelos correspondientes a los marcadores utilizados por kit InnoTyper®21 para las distintas especies (Tabla 18).

Tabla 18. Tabla de colores de perfiles genéticos de diferentes especies.

Muestra	INNOTYPER 31 CICLOS																				
	PCR Volumen total de amplificación 25 µL																				
	AC4027	MLS26	ALU79712	NBC216	NBC106	RG148	NBC13	AC2265	MLS09	AC1141	TARBP	AMEL	AC2305	HS4.69	NBC51	ACA1766	NBC120	NBC10	NBC102	SB19.12	NBC148
	I	I,N	N	I	I,N	I,N	N	I,N	I,N	I	I,N	X,Y	I,N	I,N	N	I,N	I,N	N	N	I,N	I
FTA MX HEM 1.1																					
FTA MX HEM 1.2																					
FTA MX HEM 1.3																					
FTA MX HEM 2.1																					
FTA MX HEM 2.2																					
FTA MX HEM 2.3																					
FTA MX HEM 3.1																					
FTA MX HEM 3.2																					
FTA MX HEM 3.3																					
FTA MX VEG 1.1																					
FTA MX VEG 1.2																					
FTA MX VEG 1.3																					
FTA MX VEG 2.1																					
FTA MX VEG 2.2																					
FTA MX VEG 2.3																					
FTA MX VEG 3.1																					
FTA MX VEG 3.2																					
FTA MX VEG 3.3																					
MX E. coli 1.1																					
MX E. coli 1.2																					
MX E. coli 1.3																					
MX E. coli 2.1																					
MX E. coli 2.2																					
MX E. coli 2.3																					
MX E. coli 3.1																					
MX E. coli 3.2																					
MX E. coli 3.3																					

14. CONCLUSIONES

Dado lo anterior, se demuestra que los valores obtenidos para el procedimiento indicado en el protocolo son reproducibles en el laboratorio sin variaciones significativas para la verificación de método, por lo tanto y específicamente;

- El kit demuestra una sensibilidad considerable al comparar las diferencias entre cada ensayo realizado para la cuantificación de ADN.
- Este nuevo método de amplificación y al ser procesado en condiciones diferentes a los convencionales, arrojó un resultado de 582.1462579 RFU's como umbral estocástico que se obtuvo experimentalmente, este es menor a los métodos ya verificados en el laboratorio debido al tipo de marcadores y la longitud de fragmentos de los mismos.
- La precisión del kit demuestra la confianza para ser desarrollado en el laboratorio ya que los resultados de perfiles genéticos no difieren significativamente de la validación realizada por el fabricante con respecto a la concentración a la cual se analizó.
- Al evaluar la linealidad del ensayo en cuestión se concluye que, si la concentración de ADN es menor 0.015 ng/ μ L, la señal emitida será débil o incluso despreciable lo cual puede ocasionar que no se obtenga un perfil de ADN aceptable.
- El método es reproducible pues se ha comprobado que no se perdía la precisión de los resultados que se obtuvieron tanto en tiempos cortos como largos de operación, y reproducible al variar los equipos de análisis, así como el analista.
- Es posible también optimizar el método al analizar muestras hemáticas ya que se reduce el tiempo de amplificación al disminuir el número de ciclos a 29, pues el ensayo demuestra que se logra obtener perfiles completos en este tipo de muestras a esta condición de ciclaje.
- Al ser un método nuevo se demostró que es específico para ADN humano y no es compatible con fragmentos de especies vegetales, animales o incluso de microorganismos como las bacterias.

En general, se puede llevar a cabo el uso del kit InnoTyper[®]21 para muestras que presenten alta degradación de ADN pues con esto se demuestra que cumple con los objetivos previstos así mismo dentro de los indicados normativamente.

15. BIBLIOGRAFÍA.

1. Armour J. A L., Croisier M. and Jeffreys A J. (1992) Human minisatellite alleles detectable only after PCR amplification. *Genomics* 12: 116-124.
2. Bear, R., Rintoul, D., Snyder, B., Smith, C.M, Herren, C. (2016). *Principles of Biology*. Ed.1, (pp. 266-278). Recuperado de: <http://newprairiepress.org/textbooks/1>
3. Bolivar, A.M., Rojas, A., García, L.P. (2014). PCR y PCR Múltiple, parámetros críticos y protocolo de estandarización. Volumen 3(1). Mérida-Venezuela. pp. 25-33.
4. Butler, J. (2009). *Fundamentals of forensic DNA Typing*. USA. ELSEVIER. (pp. 119-121, 175, 176, 180-183).
5. Cano, J.A., Arce, B. (2006). *Genética Forense: Crimen e Identidad*. Instituto Universitario de Investigación sobre Seguridad Interior, pp. 2-3.
6. Castañeda, F.M. (2013). Estudio de los microsatélites y miniSTRs del cromosoma X de aplicación forense. Tesis doctoral, Universidad de Cantabria, pp 78-80.
7. Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B. y Rocha, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 1ra edición. SEMARNAT. pp. 175-181.
8. Crespillo, M., Luque, J.A., Paredes, M.R. y Barrio, P.A. (2012). Criterios mínimos recomendados para la aceptación y evaluación de perfiles mezclas. Recomendaciones Comisión GHEPMIX. Ed.1, pp. 3-6.
9. Dirección de Calidad. INCIFO. (2016). Plan maestro de validación. Fiscalía General del Estado de Puebla.
10. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org
11. George, A.K. (2019). Verificación del kit InnoQuant®HY-R y determinación de la sensibilidad del kit de amplificación punto final GlobalFiler. (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
12. GEP-ISFG, Grupo español y portugués de la ISFG (2001). *Guía para implementar un sistema de calidad en los laboratorios de Genética Forense*.

13. Hackenberg, M. (2005). Dinámica evolutiva de los retrotransposones Alu en el genoma humano (Tesis de pregrado doctoral). Universidad de Granada, España.
14. ISO 17025-2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
15. Laboratorio de Genética Forense del Instituto de Ciencias Forenses. (2016). Manual de procedimientos del laboratorio de genética forense. Fiscalía General del Estado de Puebla.
16. LaRue, B.L., Sinha, S.K., Montgomery, A.H., Thompson, R., Klaskala, L., Ge, J., King, J., Turnbough, M., y Budowle, B. (2012). INNULs: A Novel Design Amplification Strategy for Retrotransposable Elements for Studying Population Variation. *Hum Heredity*, (74), pp. 27–35.
17. Loftus, A., Murphy, G., Brown, H., Montgomery, A., Tabak, J., Baus, J., Carroll, M., Green, A., Sikka, S., y Sinha, S. (2017). Development and validation of InnoQuant®HY, a system for quantitation and quality assessment of total human and male DNA using high copy targets. *Genetics*, (29), pp. 205-217.
18. Lowther, K., Reynaga, E., Anstead, J., Cassidy, B.G. (2016). Validation of the InnoQuant™ DNA Quantification & Degradation Assessment kit and the InnoTyper™ 21 PCR Amplification Kit for Use on Forensic Samples. DNA Solutions. Oklahoma City.
19. Magaña, J., Arenas, M., Gómez, R. (2009). La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. *Revista médica de Chile*. pp. 946-956.
20. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados, segunda edición, CENAM, EURACHEM, noviembre 2005.
21. Norma ISO/IEC 17020 organismos de inspección.
22. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Recuperado de:
https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf

23. Piro, O.E. (2014). Breve historia del ADN, su estructura y función. *Revista Ciencia e Investigación*. Tomo 64, número 63, pp. 26-50.
24. Prieto, S.L. (2002). Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados (Tesis de pregrado doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
25. Promega Corporation. Maxwell®16 Blood DNA Purification System, (2013), pp 3-4.
26. Ríos, S.E., Calleros, E., González, Z.A., Rubio, J., Martínez, O.C., Martínez, A., Hernández, S. y Pérez, M.R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*. DOI: 10.15174/au.2016.1078.
27. Rodríguez, C.C, Rodarte, M.B, Monter, R.M, Coss, R.A.C, Castañeda, S.A. y Rodríguez, A.R. (2010). Genética forense. *Revista Fuente Año 2*. Volumen 4, pp. 31-35.
28. Rodríguez, M.S. (2019). Validación interna de los parámetros de amplificación con el kit PowerPlex® Fusion 6C System. (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
29. Sinha, S., Murphy, G., Brown, H., Green, A., Montgomery, A., Carrol, M., Tabak, J. (2015). Retrotransposable elements: Novel and sensitive DNA markers and their application in human identity. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* (5), pp. 627-629.
30. Solano A, Playán A, López-Pérez MJ, Montoya J. Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Pública Mex* 2001;43:151-153.
31. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Revista Investigación en discapacidad*, vol.2 (2), pp. 70-78.
32. Villalobos, R.H. (2018). Las pruebas de ADN en el contexto forense. *Revista Ciencias forenses Honduras*, vol.3 (2), pp. 27-37.
<http://www.insp.mx/salud/index.html>