

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACION DE MARCADORES GENETICOS
EN MANCHAS DE SANGRE POR ELECTROFORESIS**



SILVIA CAROLINA CALDERON DONIS

Para optar al título de
Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 1,996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Dh
06
T(1417)

*JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA*

DECANO: Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

SECRETARIO. Lic. Oscar Federico Nave Herrera

VOCAL I: Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez

VOCAL II: Lic. Gerardo leonel Arroyo Catalán

VOCAL III: Lic. Rodrigo Herrera San José

VOCAL IV: Br. Ana María Rodas Cardona

VOCAL V: Br. Hayro Oswaldo García García.

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS: Todopoderoso por haberme permitido llegar a culminar mi carrera.
- A MIS PADRES: Roberto Calderón Lozano
Amanda Donis de Calderón
Que sea para ellos el mejor reconocimiento a sus esfuerzos
- A MI ESPOSO: Alejandro Salim J.
Por su amor y apoyo constante que me permitieron finalizar mi carrera.
- A MIS HIJOS: Andrea Carolina, Daniel Alejandro y José Andres. Como un ejemplo y estímulo del camino que deben recorrer en sus vidas.
- A MI TIA: Marta E. Calderón.
En agradecimiento a sus nobles consejos.
- A MIS HERMANOS: Roberto, Rolando, Mynor y Lissette.
Con mucho cariño.
- A MI FAMILIA: En especial a Obdulio Enrique Calderón y Aura de Calderón (+)
- A MIS COMPANEROS:
Y AMIGOS Por los sueños compartidos

TESIS QUE DEDICO

- A: mi patria: Guatemala
- A: La Universidad de San Carlos de Guatemala.
- A: La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- A: Mis Catedráticos
- A: Mis compañeros y amigos

AGRADECIMIENTOS

A: Licda. Eugenia Rodas, por su asesoría, en ésta tesis.

Al Laboratorio criminalístico del Gabinete de Identificación de la Policía Nacional, por permitir la realización de la parte experimental de éste trabajo.

Al International Criminal Investigative Training Assistance Program (ICITAP), por haber hecho posible la realización de ésta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	5
IV. JUSTIFICACIONES	29
V. OBJETIVOS	31
VI. HIPOTESIS	32
VII. METODOLOGIA	33
VIII. RESULTADOS	42
IX. DISCUSION	50
X. CONCLUSIONES	53
XI. RECOMENDACIONES	55
XII. REFERENCIAS	56
XII. ANEXOS	59

I. RESUMEN

Las enzimas marcadoras genéticas se han clasificado en cinco grupos, de acuerdo a sus características similares que permiten que sean analizadas en forma simultánea bajo una misma metodología.

En esta investigación se determinó la frecuencia de aparición de los fenotipos de las enzimas Esterasa D Fosfoglucomustasa y Glioxilasa I pertenecientes al grupo I, en cuatrocientas manchas de sangre seca obtenidas en los diferentes hospitales nacionales del país clasificados por regiones, tomando como representantes por región a dos de ellos: de la región del norte las muestras fueron tomadas del Hospital Nacional de Cobán y del Hospital Nacional de Puerto Barrios; en la región del sur el Hospital Nacional de Escuintla y Mazatenango; en la región del occidente el Hospital Nacional de Totonicapán y Huehuetenango; y en la región del Centro el Hospital General San Juan de dios⁽¹⁾ y del Laboratorio Clínico Popular de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Para la separación de las enzimas en sus distintos fenotipos, se utilizó el método de electroforesis en cámaras horizontales en frío, basándose éste en la separación de las moléculas por su carga neta positiva o negativa y la migración de las mismas hacia el electrodo correspondiente, ánodo o cátodo.

Los resultados mostraron que para la enzima ESD el fenotipo de mayor frecuencia de aparición es el denominado 1 en las cinco regiones estudiadas (norte 68.18%, sur 66.18%, oriente 69.32%, occidente 67.57% y centro 63.41%), siguiéndole con valores intermedios el denominado 2-1 (norte 25.00%, sur 26.47%, oriente 28.41%, occidente 27.03% y centro 30.49%) y el de valores más bajos el fenotipo llamado 2, confirmándose como un fenotipo raro dentro de las poblaciones estudiadas con anterioridad (norte 4.55%, sur 7.35%, oriente 2.27%, occidente 5.40% y centro 6.10%).

Para la enzima Fosfoglucomutasa, el fenotipo de mayor frecuencia de aparición en las cinco regiones del país es el denominado 1 (norte 68.18%, sur 67.47%, oriente 57.95%, occidente 77.03% y centro 62.20%), siguiéndole con valores intermedios el 2-1 (norte 25.00%, sur 22.06%, oriente 34.09%, occidente 17.57% y centro 36.58%) y el de menor frecuencia el fenotipo 2 (norte 6.28%, sur 1.47%, oriente 7.95%, occidente 4.05% y centro 1.22%).

Para la enzima Glioxilasa I, no fue posible la separación e identificación de sus fenotipos en las muestras trabajadas, probablemente por una degradación muy rápida de esta enzima en las muestras de sangre seca.

II. INTRODUCCION

La serología forense es una especialidad de las Ciencias Forenses que ha ido alcanzando mayor importancia a través del tiempo, de manera que para el análisis de manchas de sangre actualmente se presentan más de quince marcadores genéticos distintos que pueden proporcionar orientación acerca de la identidad de un individuo.

Dentro de los distintos marcadores que se encuentran en la sangre están las enzimas, que son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, las cuales debido al polimorfismo genético que presentan, permiten la separación e identificación de las mismas, obteniéndose así un perfil enzimático que será característico de un individuo, lo permite que sea excluido o no dentro de un marco criminalístico determinado.

Uno de los métodos que se utilizan en fluidos biológicos para la separación e identificación de las enzimas es la Electroforesis, técnica basada en la separación de las moléculas de acuerdo a sus cargas eléctricas principalmente.

Las enzimas marcadoras genéticas se han clasificado en cinco grupos de acuerdo a sus características anfotéricas similares que les permiten un análisis simultáneo, bajo una misma metodología

INSTITUTO VENEZOLANO DE SERVICIOS FORENSES
Laboratorio Central

En este trabajo se realizó la determinación de enzimas marcadoras genéticas, el grupo 1, integrado por la Glioxilasa I, Fosfoglucomutasa y Esterasa D, utilizando Electroforesis horizontal.

III. ANTECEDENTES

PRINCIPIOS GENETICOS

Los principios de la genética reconocida como una ciencia van desde las claras observaciones de Mendel, quien llegó a describir dos reglas: La ley de la segregación y la ley de la segregación independiente. (1)

A partir de entonces se han desarrollado innumerables investigaciones llegando a concluir que la información genética está contenida en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los cromosomas. (1)

Un gen consiste de un segmento de la secuencia de una cadena de DNA, la cual especifica una pieza discreta de información. El segmento es siempre denominado el Locus del gen.

Cada célula tiene un contenido genético completo. Obviamente diferentes tipos de células expresan genes distintos, así los genes de la hemoglobina son expresados solo en células rojas o eritrocitos. (1)

Se cree que la mayoría de variaciones genéticas resultan por la simple sustitución de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos en las proteínas determinan las propiedades fenotípicas y la mutación genética que altera la secuencia y las

propiedades, lo cual puede ocurrir con diferente potencial provocando que sea posible un análisis de tipificación genético. (2)

Se debe notar que la expresión fenotípica de una proteína puede ser alterada por mutaciones que ocurren en los genes. Las mutaciones afectan la regulación de algunos polimorfismos genéticos que varían la actividad enzimática. De esta manera cada individuo puede tener mutaciones, lo cual contribuye a la individualidad. (2)

Uno de los objetivos en el análisis de sangre en el campo de la criminalística es la identificación del origen, encontrándose las diferencias genéticas entre individuos. Estas diferencias intrínsecas encuentran expresión en bioquímica como marcadores bioquímicos, de los cuales se han determinado los marcadores de grupo de sangre ABO, que es un ejemplo típicamente bien conocido. (3)

Es importante notar que el descubrimiento de grupos sanguíneos ABO por Karl Landsteiner en el año de 1900, marcó la primera demostración que los individuos podrían ser sistemáticamente diferenciados a nivel bioquímico. El análisis ABO aún ocupa una posición favorable entre los marcadores utilizados en el análisis de sangre; esto se atribuye a la estabilidad del mismo y los métodos de tipificación. (1)

En el año de 1956, los marcadores proteínicos detectados por electroforesis, particularmente las enzimas marcadoras de las células rojas, han recibido mayor atención y un número considerable de las mismas ofrece aplicación práctica en criminalística para el análisis del tipo de sangre. Mucho del crédito para la introducción de marcadores genéticos en electroforesis se debe a la comunidad de las Ciencias Forenses en Londres, que abrió el camino para muchos otros laboratorios. La adopción rápida de marcadores electroforéticos en los laboratorios criminalísticos puede ser atribuido a varios factores, siendo el más importante la metodología que es simple y una vez aprendida es generalmente aplicada al grupo entero de marcadores, y es aplicable a muestras secas y muestras líquidas de sangre. (4)

Desde el año de 1900, muchos sistemas de marcadores adicionales han sido encontrados, los cuales pueden ser clasificados en varios grupos que son de interés en serología forense:

- Del sistema de grupos sanguíneos: ABO, Rh, MNSs, Kell, Duffy, Kidd;
- Del sistema de isoenzimas de las células rojas: PGM, ACP, AK, ADA, EsD, GPT, GlO, CAii, Gd, PepA, PGD;
- Del grupo sérico: Hp, Gc, Tf, Fi, Gm/Km;
- La hemoglobina; y
- El sistema HLA.

Por definición todos los sistemas de marcadores genéticos tienen en común que son heredados de manera íntegra.(3)

Estudios genéticos por electroforesis han mostrado que cerca de un tercio de todas las enzimas ensayadas exhiben un polimorfismo genético común, un descubrimiento que ha tenido impacto profundo en las ciencias biológicas, indicando que hay miles de proteínas polimórficas aún por descubrir, en adición a las reveladas por la electroforesis.(2)

Polimorfismo genético puede ser definido como la ocurrencia de la misma población de dos o más alelos del mismo locus con frecuencia apreciable (Ford, 1965; Cavalli, Sforza y Bodmer, 1971). A niveles prácticos, la frecuencia apreciable se toma como el 1% ó más.(2)

Existe un amplio potencial para la detección de diferencias genéticas bioquímicas entre individuos. Se estima que hay cerca de 10^{30} genotipos posibles en combinaciones y que la probabilidad de obtener dos marcadores iguales en dos individuos es considerado menor de 10^{-20} , manifestándose así la bioquímica individual.(4)

Se ha llegado a afirmar la teoría de que las proteínas son macromoléculas de peso molecular bien definido que forman disoluciones moleculares y son electrolitos cuyos comportamiento

se rige por los mismos principios físicos que los electrolitos pequeños. El estudio de proteínas en disolución y la separación de las mismas se ha transformado en una ciencia casi exacta. Pueden separarse por tamaño molecular con solubilidad, carga eléctrica, diferencias en sus características de adsorción y afinidad biológica por otras moléculas, siendo todos procedimientos donde el pH es determinante así como la temperatura.

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico que es mucho mayor al de los catalizadores hechos por el hombre. El nombre enzima no se empleó hasta el año de 1877, antes se sospechó de la intervención de ciertos catalizadores biológicos en la fermentación del azúcar para la formación de alcohol. En la actualidad se han identificado cerca de dos mil enzimas diferentes, por lo que se ha creado un sistema internacional para nombrarlas de acuerdo a la reacción que catalizan. (1)

La producción de una reacción enzimática es esencialmente específica y el medio en que ocurre tiene una gran interferencia con su estabilidad. Algunas enzimas son activas en lisados que han sido congelados. Similarmente, la desecación no desnaturaliza muchas enzimas, lo que permite que puedan ser

determinadas en muestras de sangre secas. (2)

La separación de enzimas sobre la base de su carga eléctrica depende de sus propiedades ácido básicas, las cuales se hayan determinadas en gran medida por el número y los tipos de grupos radicales ionizables de sus cadenas polipeptídicas. Puesto que las proteínas difieren en composición de aminoácidos y en secuencia, cada proteína posee propiedades ácido básicas características. (6)

El pH isoeléctrico es aquel en que la molécula no porta carga eléctrica neta y es incapaz de migrar en un campo. La mayoría de proteínas globulares lo poseen entre 4.5 y 6.5. (6)

Electroforesis:

El principio de la electroforesis se fundamenta en que cuando una molécula cargada es puesta en un campo eléctrico ésta emigra al electrodo apropiado: las cargas negativas hacia al electrodo positivo (cátodo) y las positivas al negativo (ánodo).

La electroforesis es un método aplicable que consta de cinco componentes esenciales: Una solución buffer, un electrodo positivo, uno negativo, una fuente de poder y un medio de soporte electroforético. (7)

Los medios de soporte electrofóretico son un componente clave para la separación de sustancias por electroforesis, y pueden ser membranas porosas o geles conteniendo el buffer entre los dos electrodos, permitiendo así la separación de las moléculas. Los más usados son el acetato de celulosa, geles de agar o agarosa, de almidón y de acrilamida. Para propósitos forenses estos soportes (membranas de 3 mm. de gel), son a menudo usados debido a que son apropiados para el análisis de muestras en pequeños volúmenes. (6,7)

Debido a que el objeto del análisis es la separación de proteínas, se debe prever la rápida velocidad electroforética y minimizar la zona de esparcimiento. Un alto voltaje dará más rápida movilidad aunque éste deba ser limitado por dos razones: La fuerza iónica del buffer, que debe ser suficiente para mantener el pH en el medio de soporte y electrodos; y el calor. Si la fuerza iónica se incrementa, así ocurre con la corriente generada y así también el calor producido. El calor incrementa la difusión resultando una zona muy extensa y puede causar la evaporación del buffer fuera del soporte creando manchas calientes, y un voltaje discontinuo que puede inactivar la sensibilidad de las enzimas durante el curso de la electroforesis. Para evitar esto, el proceso debe realizarse en frío, utilizando placas enfriadoras por contacto con el medio de soporte. (7)

El tamaño de la proteína afecta su movilidad en forma inversa, a mayor tamaño menor velocidad de corrimiento, además de ser retenidas por el medio de soporte de acuerdo a sus propiedades de tamizaje.

Algunos medios de soporte están cargados por sí mismos usualmente con carga negativa al igual que las moléculas de agua en la solución buffer, por lo que tienden a migrar al cátodo. Este fenómeno se conoce como electroendosmosis. Los Medios de soporte que poseen esta característica incluyen el almidón, acetato de celulosa y agar. (8)

MARCADORES GENETICOS

Enzimas:

FOSFOGLUCOMUTASA (PGM):

Cataliza la conversión reversible de glucosa 1-fosfato a glucosa 6-fosfato, siendo requerida glucosa 1, 6 difosfato como co-factor.

En el año de 1936, Carl y Gerti Cori reconocieron un nuevo éster glucosa fosfato en preparaciones en las cuales el músculo de rana había sido incubado con Adenosin Fosfato (AMP) y fosfato. Este éster fue convertido a glucosa 6-fosfato con el tiempo. El nuevo éster fue mostrando ser glucosa 1-fosfato (Cori y col., 1937) y llegó a ser claro en el tejido del músculo y extractos de

levadura conteniendo una actividad enzimática responsable para la conversión de glucosa 1-fosfato a glucosa 6-fosfato. La enzima fue llamada fosfogéno mutasa (Cori y col., 1938).

En el año de 1964, Spencer y colaboradores encontraron que la Fosfoglucomutasa (PGM) de diferentes personas daban tres diferentes muestras de isoenzima en electroforesis de almidón y también la histoquímica específica de la mancha. Muestras similares podían observarse en leucocitos, hígado, corazón, músculo uterino, pulmón, piel y extractos de placenta. Siete bandas de actividad fueron vistas y designadas alfabéticamente de la "a" a la "g", siendo la "a" la más catodal. Solamente de la "a" a la "d" mostraron diferencias y una simple explicación se basó en los alelos PGM₁ y PGM₂ condicionando la "a" y "c", y la "b" y "d" respectivamente. (9)

Estudios con ciento treinta y tres familias con doscientos sesenta y dos niños no mostraron ninguna excepción a esta explicación. Muchas familias estudiadas apoyaron la hipótesis de los dos alelos de herencia, incluyendo éstas a Monn (1969; Wille y col., 1969), Renninger y Spielmann (1969) y Lamm (1970). En el año de 1965, Hopkinson y Harris encontraron una familia en la cual la variación de bandas PGM fue observada en "e", "f" y "g". Estas bandas estuvieron bajo el control de un segundo locus de PGM. (10, 11)

PGM es omnipresente, ocurre en la mayoría de células de animales, plantas y microorganismos. (↵)

La enzima del músculo del conejo ha sido particularmente estudiada. El sustrato natural para la PGM es la glucosa -1 fosfato (Glc-1-p), aunque la enzima también cataliza la interconversión reversible de c-1 a grupos c-fosfato terminal de un número de azúcares, incluyendo pentosas con menos eficiencia. PGM existe en las llamadas fosfo y difosfo formas, y éstas son separables. La enzima requiere Glc-1,6-diP y Mg^{++} para actuar. Agentes quelantes como el imidazol aparecen para activara a la PGM, ya que ésta es muy sensible a la inhibición por metales pesados como el Zn^{++} y el imidazol trabaja removiendo estos iones. En la ausencia o exceso de Mg^{++} , agentes quelantes pueden inhibir. (↵)

La oxidación o bloqueo de grupos -SH reduce significativamente la actividad enzimática. PGM es también inhibida por un número de aniones orgánicos e inorgánicos.

Cinética y experimentos para transferencia han indicado que Glc-1,6-diP libre no es formada en la reacción como un intermediario obligatorio, ya la difosfoenzima no es formada en cada ciclo catalítico (Ray y Roccelli, 1964; Goumatis y col. 1967). Estos son otros hallazgos consistentes con un mecanismo en el cual la fosfoenzima-glucosa monofosfato están en equilibrio

dinámico con difosfoenzima Glc-1,6-diP como un intermediario capaz de frenar la disociación. (12)

Un esquema para la reacción es el dado por Ray y Peck (1972) mostrado en el Anexo 1. (9)

Ejemplos de la enzima PGM exhiben heterogeneidad molecular. Las especies moleculares han sido separadas ambas por cromatografía en capa fina y por electroforesis, siendo esta última la que proporciona mejor separación. (9) Estas formas son llamadas isoenzimas, y se pueden definir como especies moleculares heterogéneas determinadas por genes diferentes. Dawson y Green (1975) encontraron que la alteración sucesiva de los seis grupos sulfidrilos libres en PGM daría como resultado cambios sistemáticos en las muestras de isoenzimas.

Las isoenzimas PGM₁ han sido utilizadas en algunos laboratorios en casos de parentesco en disputa (Monn, 1969; Herbich y Pesendorfer, 1969; Kneiphoff y Nagel, 1970; Halasa, 1977; Boormasn y col. 1977). (9)

Las posibilidades de excluir un parentesco verdadero o no, son del orden del 14% en las poblaciones del este de Europa. Polesky y colaboradores (1976) dijo que las posibilidades de excluir un padre falsamente acusado caucásico por el sistema PGM₁ es del 14.21%, mientras para un padre negro es de un 11.86%.

Estas figuras son aplicables a U.S.A. (9)

Las posibilidades de encontrar en alelo silencioso de PGM₁, no debe ser pasada por alto, ya que aunque muy raros, existen y pueden dar interpretaciones incorrectas a investigadores del origen. (11)

Welsh y colaboradores (1979) mostraron que el aumento esperado en exclusión de probabilidades en casos de nacimientos usando enfoque isoeléctrico para fenotipos PGM₁, es realizado en la práctica. (9)

En 1967, Culliford reportó que en manchas de sangre secas pueden ser exitosamente tomadas las muestras para isoenzimas PGM₁. El método fue uno original de Spencer y colaboradores (1964). Electroforesis horizontal con gel de almidón, y fue ejecutado cerca de diecisiete horas a 5° C, usando 0.1 M Tris, ácido maléico 0.1 M, EDTA 0.01 M y MgCl₂ 0.01 M, ajustado a un pH de 7.4 con NaOH como buffer puente y una disolución 1:10 de esta disociación como buffer del gel. Los geles fueron esparcidos horizontalmente siguiendo electroforesis y corridos en un 1% de gel de Agar conteniendo Glc-1-P, Glc-1,6 diP, MgCl₂, NADP, Glc-6-P deshidrogenasa, PMS y MTT. (9)

La actividad de la Fosfoglucomutasa está basada en la secuencia de reacción explicada en el Anexo 2, que se lleva a

cabo en la mancha a analizar. (9)

El NADPH generado en la secuencia de reacción, reducirá el MTT tetrazolium teniendo a el formazan insoluble en la presencia de PGM₁. Debe notarse que la Glc-1,6-diP es requerida en cantidades mínimas catalíticas y que la mayoría de muestras, aunque contengan impurezas, éstas no serán mayores que las cantidades catalíticas de muestra.

Wraxal y Culliford (1968) encontraron que los geles de soporte deberían ser delgados (cerca de 1 mm) y que la enzima por correr debe colocarse suficientemente lejos para no tener que moverla previo la aplicación de la mezcla reveladora. La técnica es descrita claramente por Culliford (1971). (9)

Los fenotipos del segundo locus podrían ser determinados para PGM₂, pero las isoenzimas de este locus no son tan estables como las del PGM₁, ya que las anteriores se detectaron en manchas de una semana o dos de antigüedad, mientras que las últimas en manchas de dos meses de antigüedad. (11)

Existen muchas modificaciones a la técnica del prodecimiento original. Brinkman y Fritz (1968) describen un sistema Buffer para PGM con los componentes esenciales ajustado a un pH distinto. El gel hecho en disolución 1:9 ajustada a pH de 7.5. Agar y Agarosa utilizados como medio de soporte. Monn (1968) usó

Reinagar en vez de agarosa y Bactoagar que fue tratado para su uso. (9)

Wraxal y Stolorow (1978) divisaron un procedimiento para determinar PGM, ESD y G10 en un mismo plato, que es aplicable a lisados y a manchas de sangre.

Marbach (1980) corrió una serie de experimentos en los cuales la concentración de PMS en la capa reveladora usada para visualizar PGM fue variada. Es bien conocido que el fondo del gel obscurece lentamente bajo la incubación con PMS y Mtt por la sensibilidad del sistema a la luz. Muchos autores han recomendado rangos de concentración de PMS de 0.16 a 0.65 mM. Marbach (1980) dijo que la concentración de PMS de 0.16 daba resultados claros en el recorrido.

Goetz y Baxter (1980) reportaron un caso interesante en el cual dos especímenes de sangre fueron idénticos en ABO, Rh, Mn, Hp, AD, ADA y G10 y fueron discriminados por la PGM.

Culliford (1971) dijo que la isoenzima PGM₁ fue usualmente determinada en manchas de sangre de cuatro semanas de vida y ocasionalmente arriba de las doce semanas.

Brinkman (1969) afirmó que las manchas en materiales absorbentes fueron corridas por arriba de siete semanas, y

manchas secas en un sustrato duro por arriba de doce semanas.

Tothwell (1970) encontró que PGM fue corrida en algunas manchas de cinco meses de edad, mientras que otras dieron resultados erróneos los dos meses. Cerca de la mitad de las manchas fueron corridas a tres meses, 16% a cinco meses y por seis meses y la actividad enzimática fue virtualmente perdida en toda las muestras.

Torowska reportó que dos meses son confiables para correrlas con credibilidad. La humedad elevada aumenta el rango en que las enzimas se vuelven indetectables.

Raszeja y Miscika (1976) y Miscika y colaboradores (1977) afirmaron que seis meses de edad aún eran confiables. Las manchas fueron determinables rutinariamente y se obtuvieron buenos resultados de una mancha de dos años y medio de edad.

Zajac y Sprague utilizaron manchas de veinte meses de edad en sus trabajos. (9)

Herzog y Sobotka (1972) encontraron que el 90% de las muestras permanecidas a temperatura ambiente por ciento seis días pudieron agruparse para PGM, y los resultados obtenidos con muestras post-mortem de cuatro semanas de edad aún pueden ser confiables. (9)

GLIOXILASA I (G10):

Cataliza la conversión reversible del glutatión reducido y el metil glioxal a S-lactoil glutatión. En conjunción con su enzima compañera Glioxilasa II (G10 II); Hidroxiacil glutatión hidrolasa: s-2 hidroxiacil glutatión hidrolasa, la cual cataliza la conversión hidrolítica de s-2-Hidroxiacilglutatión a glutatión y el correspondiente 2-hidroxiacida; sobre todo la conversión de metil glioxal a lactato puede ser efectuada. (13)

La presencia de una actividad enzimática en los tejidos animales la cual cataliza la conversión de metil glioxal a lactato, y de fenilglioxal a ácido mandélico, fue simultáneamente reconocida por Neuber (1913) y por Dankin y Dudley (1913), quienes son los responsables del nombre glioxilasa. También notaron que la enzima estaba presente en las células rojas, pero no en el suero de la sangre en el perro.

En el año de 1932, Lohman estableció que glutatión reducido fue requerido para la actividad de la glioxilasa.

Jowett y Quartel (1933) encontraron que los eritrocitos contenían en los humanos actividad sustancial de G10, y propusieron que S-lactoilglutatión era un intermediario en la reacción a lactato. (13)

Yamazoye (1936) demostró la formación de glutatión metil

glioxal en extractos de hígado crudo.

En el año de 1948, Hopkins y Morgan obtuvieron evidencia en preparaciones de corazón, de que una proteína aceleraba la formación de lactato del metil glioxal y glutatión en la presencia de Glioxilasa.

En el año de 1951, Racker demostró que la levadura contiene dos glioxilasas, a las cuales él llamó I y II.

Los eritrocitos humanos contienen cantidades sustanciales de GIO I, pero no de GIO II (Cohen y Sober, 1945; Valentín y Tamaka, 1961; Paar y col., 1977).

Las enzimas Glioxilasa son ampliamente distribuidas en la naturaleza. (13)

El descubrimiento de su polimorfismo es relativamente reciente. En 1975 Kompf y colaboradores en Alemania y Bagstery y Paar en Inglaterra independientemente descubrieron que GIO exhibe una variación genética determinada electroforéticamente en glóbulos rojos. Tres fenotipos fueron observados y fueron llamados "1", "2 - 1" y "2" por German, y lenta, intermedia y rápida por los ingleses. Esto podía ser explicado por los alelos autosómicos. Un par de ellos co-dominantes y estudios de familias y poblaciones confirmaron esta idea. (14)

Los alelos que determinan los fenotipos comunes son ahora denotados G10₁ y G10₂.

Procedimientos para su análisis fueron dados por Racker (1955). Los métodos usados han tomado ventaja de que el glutatión reducido ocurre donde sea en el gel, excepto los sitio de actividad de G10.

Dos procedimientos basados en el color de la reacción de GSH no reactiva han sido vistas. En uno de estos MMT sal de Tetrazolium es disuelta en gel de agar en la presencia de PMS o cualquiera de las dos (Kempf y col. 1975; Bagster y Paar, 1975), y recubiertos en geles electroforéticos. Estas capas pueden contener sustratos de G10 o pueden ser añadidos después de incubación del gel electroforético con papel filtro recubierto conteniendo los sustratos. Sitios de actividad aparecen como zonas claras en una franja violeta (Formazan).

En el segundo introducido por Paar y colaboradores (1977), el gel recubierto con los sustratos de G10 en papel filtro e incubado para permitir que la reacción ocurra. Es entonces recubierto con una solución iodada en gel de agar. El glutatión sin reaccionar reduce al iodo, excepto en los sitios de actividad G10 donde reacciona el Iodo con el almidón en el gel electroforético dando el familiar azul profundo.

Otro procedimiento usado por Bagster y Paar (1975), es el de añadir los sustratos a lo largo con G10 exógena, LDH, NAD, FMS y MTT al gel cubierto. La G10 II cataliza la formación de lactato de s-lactoil glutatión en los sitios de actividad de G10 II, y el lactato es oxidado a piruvato por LDH con la concomitante reducción de NAD y NADH, y el NADH reduce al MTT tetrazolium a formazan en la presencia de FMS, según puede observarse la reacción en el Anexo 4. (13, 14)

La primera Glioxilasa purificada fue una enzima de la levadura (Racker, 1951). Más recientemente se obtuvieron de eritrocitos del cerdo (Mannervick y col., 1972; Aronson y col., 1978).

Luego de encontrarse en eritrocitos de la rata (Han y col., 1977), en los glóbulos rojos humanos (Aronson y col., 1978). (15)

Existen algunos rasgos en discusión sobre la utilización de G10 en la paternidad en disputa porque es relativamente nuevo el hallazgo de su polimorfismo. Debido a la frecuencia de distribución de sus fenotipos, G10 será uno de los mejores alelos disponibles.

Brinkman y Fuscjel (1978) recomendó el uso de G10 en estos casos, al igual que Ericksen (1979) quien dijo que la probabilidad de exclusión fue del orden del 18% en Dinamarca,

siendo esto muy similar en Viena (Fausch y col., 1979), y en Polonia (Jaklinski y Koziol, 1979). Se encuentran pocos datos en U.S.A., pero no sería irrazonable esperar que la probabilidad de excluir a un padre falsamente acusado sea cerca de 0.18.

G10 ha sido trabajado en geles de almidón y otros medios electroforéticos. Paar y colaboradores (1977) usó buffers fosfato a pH 6..7 para esta sistema, mientras que Kompf y colaboradores (1975) usó trihistidina como sistema buffer a pH 7.8.

Martin y Ott (1976) corrieron isoenzimas G10 en geles de Agarosa en buffers de Tris a pH de 7.8.

La disociación es más rápida en Agarosa que el almidón, y los platos pueden ser corridos en menos de una hora y media. Meera Khan y Doppert (1976) dio un procedimiento para correr G10 en geles de acetato de celulosa en buffers de pH 8.

Wraxal y Stolorow (1978) describieron una técnica en la cual G10 es combinada con PGM y ESD con el mismo gel electroforético. El gel de corrido es hecho de 2% de almidón y 1% de Agarosa, y el buffer original de PGM del sistema de Spencer y colaboradores (1964 b), en este sistema G10 corre hacia adelante en el ánodo, PGM y ESD pueden ser detectadas separadamente. (13)

ENZIMA ESTERASA D:

Las carboxilesterasas ocurren en una gran variedad de tejidos. A través de los años esquemas de clasificación han sido propuestos para traer algún orden a este grupo de enzimas. La clasificación está basada primariamente en la especificación del sustrato de la enzima. (15)

Las isoenzimas esterasa en la sangre del ratón y tejidos fue extensivamente estudiada (Market y Hunter, 1959; Hunter y Strachman, 1961). En 1961 Tashian aplicó la electroforesis en gel de almidón al estudio de glóbulos rojos humanos y una gran variedad de trabajos pioneros fueron hechos en su laboratorio. (16)

Nueve bandas de actividad esterasa pudieron ser resueltas en geles de almidón por elctroforesis a pH 8.6 usando buffers de NaOH-ácido bórico y alfa naftil acetato, propionato y butirato como sustratos. Tashian y Shaw estudiaron las variantes de las esterasas nombrándolas "A" y "B", luego en 1969 caracterizaron las anhidrasas carbónicas y que no tienen relación para llamarse D.

En el año de 1973, Hopkinson y colaboradores descubrieron una nueva esterasa en los glóbulos rojos, la cual había sido detectada usando sustratos fluorogénicos, 4-metilumbelliferyl butirato (MUA y MUB). Ellos llamaron a esta enzima esterasa D, y el locus controlando su expresión exhibe polimorfismo genético

en todas las poblaciones estudiadas. (15)

Esterasa D puede ser resuelta por gel de almidón en electroforesis con diferentes sistemas buffers, pero el más satisfactorio ha sido el Tris-citrato-borato-LiOH a pH 7.2.

Tres formas principales de ESD fueron vistas en glóbulos rojos lisados y fueron designadas ESD₁, 1-2 y 2.

Estudios con familias indican que estos fenotipos representan la expresión de un par de alelos co-dominantes ESD₁ y ESD₂ en un locus autosómico. El polimorfismo ESD fue investigado en europeos, negros e indios asiáticos, encontrándose de 0.9 en negros y blancos y de 0.77 en gente india. Así, en poblaciones de negros y blancos, cerca del 80% de personas son ESD₁, cerca del 20% son 2-1 y la ESD₂ es relativamente rara (1%). En los indios asiáticos hubo 63% de ESD₁, 28% ESD 2-1 y 9% de ESD₂. (16)

Un alelo raro, ESD₃, fue reportado por Bender y Frank (1974) y fue detectado como un ESD 3-1. Un alelo adicional fue detectado por Berg y colaboradores (1976) en dos miembros de una familia; uno fue ESD 4-1 y el otro ESD 4-2. Sparkers y colaboradores (1979) han documentado un probable alelo silencioso de ESD, ESD₀ en una familia. (15)

Muchos investigadores han confirmado la hipótesis de la

herencia para ESD. El locus ESD ha sido tentativamente asignado a el cromosoma 13 (Van Heymingen y col., 1975).

Krish (1971) revisó los estudios bioquímicos de más alta pureza en carboxil esterases, pero hay pocos estudios en esterases de tejidos humanos.

En sangres hemolisadas o almacenadas pueden algunas veces presentar bandas de almacenamiento. Estas aparecen con menos frecuencia en la presencia de 20 mM de Mercaptoetanol. Scott y Wright (1978) realizaron un estudio en el cual mostraron que los ésteres metilumbelliferyl fueron los mejores sustratos. (15)

Ninguna preferencia fue encontrada en la aplicación de locus E_1 o E_2 en el parentesco en disputa. Chakraborty y colaboradores (1974) expresó que cerca del 1 ó 2% de blancos y cerca del 0.5% de negros falsamente acusados de padres podrían ser excluidos por la ESD solamente. Los valores para la población británica son del 9%, según Prokop, Boorman y colaboradores (1977). Polesky y colaboradores (1976) dijo que 8.06% fue la cifra para Estados Unidos por igual para blancos y negros. Ellos si recomiendan el sistema para parentesco (Dykes y Polesky, 1977). (16)

Fenotipos de manchas de sangre fueron descritos primero por Blake y Sensabaugh en 1974, y mucho de esto se ha publicado separadamente. (17)

10 de 1974
MEXICALTA

Dos sistemas buffers fueron encontrados apropiados para correr por electroforesis la ESD: uno fue el sistema original ACP de Hopkinson y colaboradores (1963), y el otro el sistema buffer original de FGM de Spencer y colaboradores (1964).

El sistema FGM fue recomendado como el preferido, notándose que los fenotipos ESD son detectados por fluorescencia del metilumbelliferona bajo la luz ultra violeta en los sitios de actividad.

Parkin y Adams (1975) descubrieron un procedimiento para correr ESD en manchas de sangre, mediante el cual manchas almacenadas aún después de tres semanas pueden ser corridas.

Hayward y Bosworth (1975) describen otro procedimiento: emplearon buffer de citrato-fosfato a pH 5.9 en electroforesos, y recomendaron la sustitución de MUB por MUA como sustrato.

Blake y Sensabaugh (1974) recomendaron la corrida simultánea de FGM, ESD en el mismo gel. (16)

Wraxal y Stolorow (1978) describieron un procedimiento usando el sistema buffer original de FGM para corrimiento simultáneo de ESD, FGM y G10. (16)

IV. JUSTIFICACIONES

En las ciencias forenses se hace la diferenciación de individuos en forma sistemática, para ello es necesario implementar técnicas y procedimientos que permitan excluir o incluir a una persona dentro de determinada población, por lo que a través de la técnica electroforética, utilizando marcadores genéticos (enzimas polimórficas), se proporciona información para el marco criminalístico analizado, partiendo de una evidencia, en este caso una mancha de sangre que va a contribuir a la aplicación de la justicia.

La técnicas electroforética se prefiere porque utiliza procesos analíticos con altos niveles de sensibilidad, requiriendo pequeñas cantidades de muestra para el análisis.

Se aplican las enzimas marcadoras genéticas porque dividen a la población imparcialmente a través de los diferentes polimorfismos que presentan cada una de ellas.

En este estudio se utilizan como marcadores genéticos las enzimas del grupo I (Fosfoglucomutasa, Glioxilasa I y Esterasa D), porque poseen características similares que les permiten ser identificadas bajo un mismo sistema, sin embargo, existen enzimas clasificadas en cinco grupos distintos.

El muestreo se realizó en cinco regiones: norte, sur, oriente, occidente y centro, porque cada una de ellas posee poblaciones con características étnicas que las hace diferenciables entre sí, proveyendo variabilidad en el muestreo.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la prevalencia de enzimas marcadores genéticos en la población de las distintas regiones del país.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la expresión fenotípica de las enzimas Fosfoglucoamasa, Esterasa D y Glioxilasa I en las cinco regiones del país (norte, sur, oriente, occidente y centro).
- Proporcionar resultados que puedan ser utilizados de referencia en los análisis serológicos que se realicen con manchas de sangre en el Laboratorio criminalístico de la Policía Nacional.

VI. HIPOTESIS

Los fenotipos de las enzimas Fosfoglucomutasa Glioxilasa I y Esterasa D, marcadores genéticos, se distribuyen en forma diferente en la población guatemalteca de acuerdo a cinco regiones: Norte, sur, oriente, occidente y centro.

VII. METODOLOGIA

UNIVERSO DE TRABAJO

Cuatrocientas manchas de sangre obtenidos de la población guatemalteca que acude a los hospitales nacionales de las cinco regiones del país, quienes en forma voluntaria quisieron contribuir con este estudio.

METODO

Recopilación de Información:

Las muestras de sangre fueron recopiladas de varios hospitales nacionales, distribuidos así:

- Región Norte: Hospital Nacional de Puerto Barrios, cuarenta y cuatro muestras. Hospital Nacional de Cobán, cuarenta y cuatro muestras.
- Región Sur: Hospital Nacional de Escuintla, treinta y un muestras. Hospital Nacional de Mazatenango, treinta y un muestras.
- Región Oriente: Hospital Nacional de Zacapa, cuarenta y cuatro muestras. Hospital Nacional de Chiquimula, cuarenta y cuatro muestras.
- Región Occidente: Hospital Nacional de Huehuetenango, treinta y ocho muestras. Hospital Nacional de Totonicapán, treinta y seis muestras.
- Región Centro: Hospital General San Juan de Dios, cuarenta y dos muestras. Laboratorio Clínico Popular de

la Universidad de San Carlos, Cuarenta muestras.

Recursos:

RECURSOS HUMANOS

- Personas que acuden a los diferentes hospitales nacionales mencionados en el numeral anterior;
- Investigador;
- Asesor y co-asesor de la investigación.

RECURSOS MATERIALES

- Cámaras de electroforesis horizontales: E 005;
- Fuente de poder: E 028;
- Corcuito refrigerante: E 001/8;
- Control de voltaje;
- Horno;
- Congelador;
- Cronómetro;
- Balanza analítica;
- Nivel y soporte para colocar los platos;
- Platos de vidrio de 20 X 15 y de 20 X 20: E 006;
- Probetas de 1000 ml;
- Probetas de 25 ml;
- Beakers de 2,000 ml;
- Erlenmeyer de 250 ml;
- Erlenmeyer de 50 ml;

- Micropipetas: S 238-1, 2 y 3;
- Pinzas finas;
- Papel filtro;
- Reactivos;
- Agua desmineralizada.

PROCEDIMIENTO

Preparación de Materiales:

Para la toma de muestras se elaboraron tarjetas de cartulina blanca de trece centímetros de largo por siete centímetros y medio de ancho, las cuales se identificaron con un sello con varios datos, principalmente: Número de muestra, fecha de toma de muestra, lugar, tomada por y observaciones.

Cada tarjeta llevaba engrapado un pedazo de tela de algodón de color blanco de cinco por cinco centímetros y un papel parafinado con las mismas medidas que sirvió para evitar el paso de la humedad. Cada tarjeta se colocó dentro de un sobre de manila de las mismas medidas, el cual se identificó con los mismos datos que la tarjeta.

Toma de Muestras:

Se extrajeron aproximadamente 3 ml. cúbicos de sangre a cada uno de los donadores utilizando jeringas descartables, y luego por goteo se impregnó el cuadro de tela en su totalidad. En las tarjetas previamente preparadas se dejó secar a temperatura ambiente y luego se guardaron en los sobres y se almacenaron a

una temperatura de 0°C a 4°C hasta que fueron utilizadas.

Preparación de las Muestras:

De cada uno de los cuadros de tela con la sangre seca y a congelación, se cortaron hilos de un centímetro de largo que se colocaron en tubos plásticos para centrifuga de 1.5 ml. de capacidad, almacenándolos a su vez en gradillas a temperatura de congelación claramente etiquetados con el número correspondiente de muestra. De uno de los tubos mencionados se extrajeron cuatro hilos colocándolos en porta-objetos identificados con el número de muestra. A estos se añadió media gota de reactivo de Cleland's para lisar los glóbulos rojos y liberar las enzimas de los mismos dejándolo actuar sobre los hilos durante diez minutos.

Preparación del Buffer del Tanque:

- Pesar 24.22 grs. de Trizma Base, 23.24 grs. de Acido Maleico, 6.72 grs. de EDTA di sódico y 10 grs. de Hidróxido de sodio en perlas;
- Disolver lo anterior en 1,500 ml. de agua destilada y luego aforar a 2,000;
- Ajustar el pH 7.4 con una solución saturada de Hidróxido de sodio.

Esta solución se coloca en el tanque catódico y anódico de las cámaras electroforéticas.

Preparación del Buffer del Gel:

Preparar una solución 1:15 del Buffer del tanque y agua destilada y desmineralizada.

Preparación del Buffer de Reacción:*Para ESD:*

- Pesar 0.82 grs. de acetato de sodio anhidro y disolver en 200 ml. de agua desmineralizada;
- Ajustar el pH a 6.5 con ácido acético 0.1 M.

Para PGM:

- Pesar 2.4 grs. de Trizma Base y 0.8 grs. de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y disolver en 100 ml. de agua desmineralizada;
- Llevar el pH a 6.2 con HCL 6 N.

Para G10:

- Pesar 2.42 grs. de NaH_2PO_4 y 1.31 grs. de Na_2HPO_4 ;
- Disolver en 100 ml. de agua desmineralizada y llevar a pH de 6.2 con HCL 6 N.

Preparación del Gel del Plato:

Pesar 0.6 grs. de Agarosa tipo I y 1.2 grs. de almidón hidrolizado, disolverlo en 60 ml. del buffer de gel utilizando calor y agitación constante.

Preparación de las Mezclas de Revelado:*Para ESD:*

Pesar 0.004 grs. de Metil Umbelliferil acetato (MUA) y disolverlo en 200 ul de acetona. Añadir 10 ml. del buffer de reacción.

Para PGM:

- Pesar 0.035 grs. de Glucosa-1-fosfato con 1% de G-1,6-P, 0.022 grs. de NADP sal de sodio y 0.0025 grs. de MTT;
- Medir 400 ul de Meldola Blue, 10 ml. del buffer de reacción, 20 ul de G6PD y 10 grs. de agar al 2%.

Mezclar los sólidos con los líquidos en el orden citado.

Para G10:

PASO 1: Pesar 0.12 grs. de Glutación Reducido, medir 1 ml. de Methyl Glioxal al 2.5% y 10 ml del buffer de reacción. Mezclar y disolver;

PASO 2: Disolver 0.5 grs. de Agarosa tipo 1 en 30 ml. de agua calentando y agitando constantemente. Guardar la solución en un horno a 60°C. Medir 200 ul de solución iodada (Ver Anexo 6).

Condiciones de Corrido:

400 voltios por dos horas con quince minutos.

Revelado:

DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO

- Encender el baño de circulación de agua refrigerante a una temperatura no mayor de 5°C;
- Preparar el Buffer del Tanque, el Buffer del Gel y el Buffer de Reacción para cada enzima. Pueden hacerse semanalmente;
- Limpiar con acetona los platos de vidrio de 20 X 15 cms. y colocarlos en el horno a 60°C;
- Verter en los platos calientes el Gel del plato recién disuelto y dejarlo solidificar a temperatura ambiente, luego colocar el plato en la cámara de electroforesis en frío hasta que vaya a utilizarse;
- Utilizando una plantilla elaborar los pozos en el plato con un cortador de pozos a 3 cms. del origen catódico;
- Colocar en cada uno de los pozos cuatro hilos de cada muestra previamente humedecidos con el reactivo de Cleland's colocando siempre en cada plato dos estándares en los pozos número 3 y 5, lo cuales se preparan de igual forma que las muestras (con Cleland's), disolviendo la sangre de los estándares e impregnándola en hilos de la casa: Seri Clasificación No. 8. De estos se colocan 2 en cada pozo utilizando pinzas finas;
- Colocar los platos montados con las muestras y estándares en las cámaras electroforéticas por dos horas y quince minutos a 400 voltios, utilizando como puente esponjas sumergidas en los tanques de las cámaras con el Buffer;

- Utilizar varillas de plástico para fijar las esponjas a los platos y por último cubrir el plato con otro plato de vidrio;
- Sacar el plato de la cámara de electroforesis y proceder a revelar;
- Para ESD, verter la mezcla reveladora sobre un plato de vidrio y empapar en ella un pedazo de papel filtro de 10 X 15 cm. que debe colocarse del origen de los pozos hacia el lado anódico. Colocar en el horno a 37°C durante diez minutos y proceder a leer las bandas colocando el plato sobre una fuente de luz ultra violeta. Retirar el papel y proceder:
- Para G10 verter la mezcla reveladora del paso 1 sobre un vidrio y empapar un pedazo de papel filtro de 8 X 15 cms. y colocarlo al final anódico hacia el origen. Proceder:
- Para FGM verter la mezcla reveladora sobre la región donde se reveló la enzima ESD (parte inferior del plato) colocando varillas plásticas alrededor de esta región hasta que el gel de esta mezcla se solidifique a temperatura ambiente. Colocar en el horno a 37°C por veinticinco minutos y proceder:
- Para G10 quitar el papel filtro y cercar toda el área con varillas plásticas. Añadir el gel del paso 2 previa mezcla del mismo con la solución iodada. Dejar solidificar y colocar en el horno a 37°C por media hora;
- Leer las bandas de G10 colocando el plato sobre una caja de

37°C por media hora más y proceder a leer las bandas.

— Si FGM aún no se observa, colocar el plato en el horno a

luz blanca y observar también las bandas de FGM;

LISTA DE REACTIVOS

- T 1503 Trizma Base;
- M 0375 Acido Maléico;
- ED 255 Na_2 EDTA;
- S 5881 NaOH pellets;
- S 8750 Acetato de sodio anhidro;
- S 8625 Acetato de sodio trihidratado;
- N 00250 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$;
- S 0751 NaH_2PO_4 ;
- S 0876 $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$;
- S 4501 Almidón Hidrolizado;
- M 0883 MUA (Metilumbelliferil-acetato);
- M 0505 NaDP sal de sodio;
- M 2128 MTT;
- D 8142 Meldola Blue; Disolver 5 mg. en 10 ml. de agua destilada.
- G 4251 Glutación reducido;
- M 0252 Metilglioxal; Diluya 1 ml. de Metilglioxal a 140% en 16 ml. de agua destilada. Almacene a 4°C.
- D 0632 DTT (Ditiotreitol) (Cleland's); Pesar 0.0077 g. de DTT y diluirlo en 1 ml. de agua (prepararlo semanalmente). Almacene a 4 °C.
- G 1259 Glucosa 1-fosfato deshidrogenasa (G-1P-d);
- A 7002 Agar purificado;

Agar
 al 21%
 10 g. en 500 ml. de agua hasta disolver. Colocar en recipiente plástico con tapadera y guardarlo a 4°C.

Solución
 Yodada
 Disolver 1.65 g. de KI y 1.50 de I en 30 ml. de agua destilada tibia, agitar 5 minutos y filtrar. Guardar en frasco obscuro a 4°C.

R 550
 SERI
 Estándar de sangre. Contiene sangre seca para reconstituir con fenotipos 2-1 para cada una de las enzimas ensayadas, es decir, con fenotipos conocidos;

G 5888
 A 6013
 Agarosa tipo 1;
 Acido Acético concentrado (Hac);
 Acido Clorhídrico concentrado (HCl);
 Acetona;
 R 550
 SERI
 Estándar de sangre. Contiene sangre seca para reconstituir con fenotipos 2-1 para cada una de las enzimas ensayadas, es decir, con fenotipos conocidos;

VIII. RESULTADOS

TABLAS DE FRECUENCIAS DE LOS FENOTIPOS POR ENZIMA EN CADA REGION DEL PAIS

REGION ORIENTE		ZACAPA	CHIQUIMULA	
Enzima	Fenotipos	Frecuencias	Frecuencias	TOTAL
ESD	1	29	32	61
	2 - 1	13	12	25
	2	2	0	2
TOTALES		44	44	88
PGM	1	21	30	51
	2 - 1	17	13	30
	2	6	1	7
TOTALES		44	44	88

REGION NORTE		PUERTO BARRIOS	COBAN	
Enzima	Fenotipos	Frecuencias	Frecuencias	TOTAL
ESD	1	27	33	60
	2 - 1	14	8	22
	2	2	2	4
	No Actividad	1	1	2
TOTALES		44	44	88
PGM	1	25	35	60
	2 - 1	16	6	22
	2	3	3	6
TOTALES		44	44	88

REGION OCCIDENTE		TOTONICAPAN	HUEHUET.	
Enzima	Fenotipos	Frecuencias	Frecuencias	TOTAL
ESD	1	24	26	50
	2 - 1	9	11	20
	2	3	1	4
TOTALES		36	38	74
PGM	1	28	29	51
	2 - 1	6	7	30
	2	2	1	7
	No Definido	0	1	1
TOTALES		36	38	74

REGION SUR		ESCUINTLA	MAZATE.	
Enzima	Fenotipos	Frecuencias	Frecuencias	TOTAL
ESD	1	24	21	45
	2 - 1	11	7	18
	2	2	3	5
TOTALES		37	31	68
PGM	1	28	24	52
	2 - 1	8	7	15
	2	1	0	1
TOTALES		37	31	68

REGION CENTRO		GUATEMALA	
Enzima	Fenotipos	Frecuencias	TOTAL
ESD	1	52	52
	2 - 1	25	25
	2	5	5
TOTAL		82	82
PGM	1	51	51
	2 - 1	30	30
	2	1	1
TOTAL		82	82

TABLA DE PORCENTAJES DE LOS FENOTIPOS DE CADA ENZIMA POR REGION

REGION NORTE

Enzima	Fenotipos	Porcentaje (%)
ESD	1	68.18
	1 - 2	25.00
	2	4.55
	No Actividad	2.27
TOTAL		100.00
	1	68.18
	2 - 1	25.00
	2	6.82
TOTAL		100.00

REGION SUR

Enzima	Fenotipos	Porcentaje (%)
ESD	1	66.18
	1 - 2	26.47
	2	7.35
TOTAL		100.00
	1	76.47
	2 - 1	22.06
	2	1.47
TOTAL		100.00

REGION ORIENTE

Enzima	Fenotipos	Porcentaje (%)
ESD	1	69.32
	1 - 2	28.41
	2	2.27
TOTAL		100.00
	1	57.95
	2 - 1	34.09
	2	7.95
TOTAL		100.00

INSTITUCIÓN DE INVESTIGACIONES DE QUETZALÁ

REGION OCCIDENTE

Enzima	Fenotipos	Porcentaje (%)
ESD	1	67.57
	1 - 2	27.03
	2	5.40
TOTAL		100.00
	1	77.03
	2 - 1	17.57
	2	4.05
	Indefinido	1.35
TOTAL		100.00

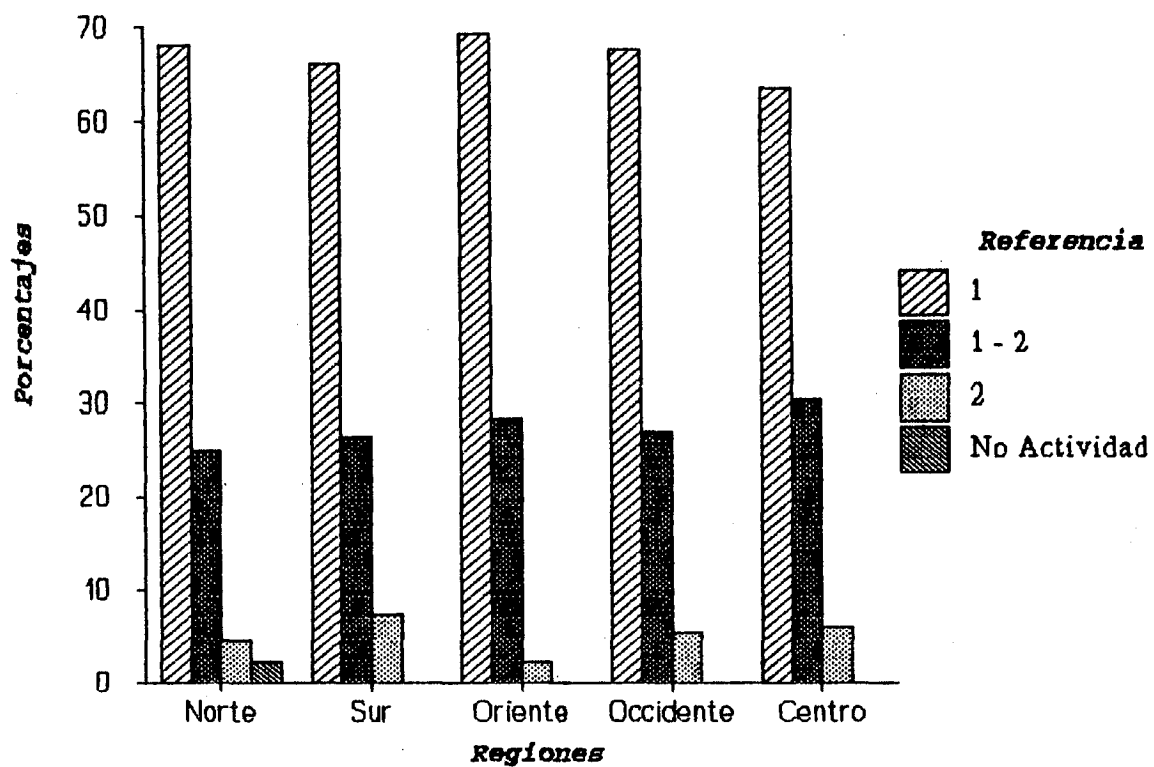
REGION CENTRO

Enzima	Fenotipos	Porcentaje (%)
ESD	1	63.41
	1 - 2	30.49
	2	6.10
TOTAL		100.00
	1	52.20
	2 - 1	36.58
	2	1.22
TOTAL		100.00

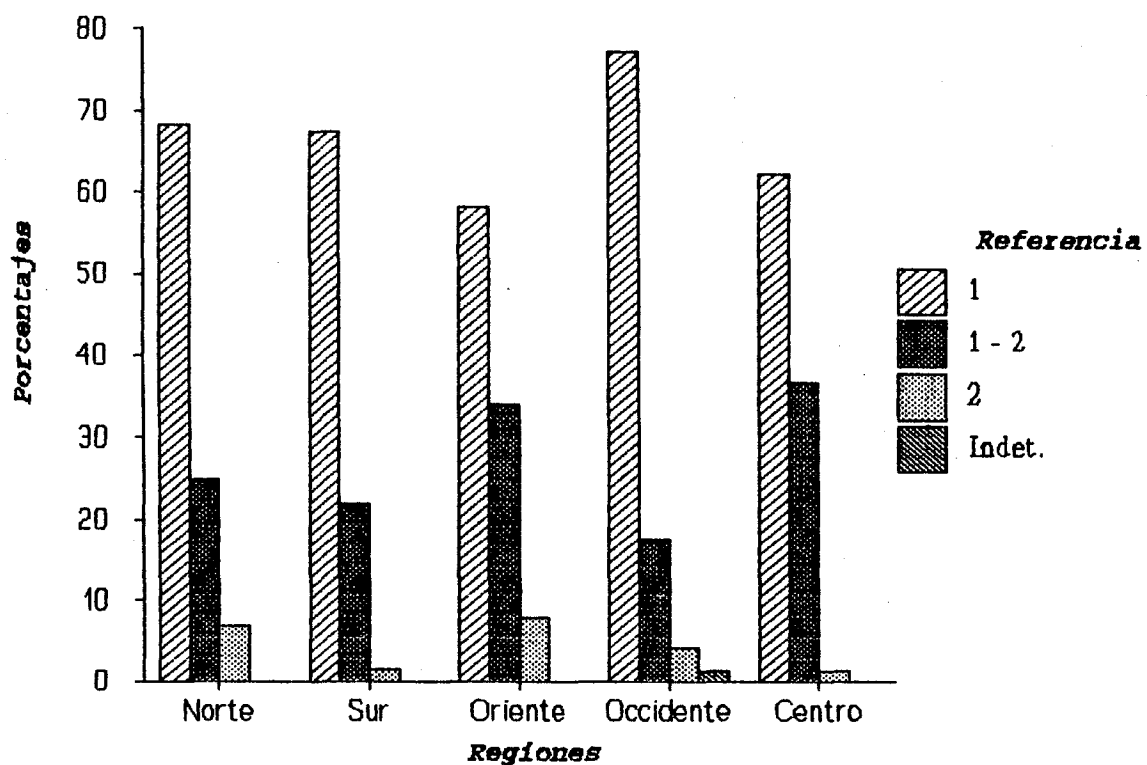
TABLA DE PORCENTAJES DE FRECUENCIA DE LOS FENOTIPOS DE CADA
ENZIMA DE LAS CINCO REGIONES DEL PAIS

ENZIMA	FENOTIPOS	NORTE	SUR	ORIENTE	OCCIDEN.	CENTRO
ESD	1	68.18	66.18	69.32	67.57	63.41
	1 - 2	25.00	26.47	28.41	27.03	30.49
	2	4.55	7.35	2.27	5.40	6.10
	Indet.	---	---	---	---	---
	No activ.	2.27	---	---	---	---
TOTAL		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
PGM	1	68.18	67.47	57.95	77.03	62.20
	1 - 2	25.00	22.06	34.09	17.57	36.58
	2	6.82	1.47	7.95	4.05	1.22
	Indet.	---	---	---	1.35	---
TOTAL		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

GRAFICA DE PORCENTAJES DE FRECUENCIAS DE LOS FENOTIPOS DE LA ENZIMA ESD.



GRAFICA DE PORCENTAJES DE FRECUENCIAS DE LOS
FENOTIPOS DE LA ENZIMA PGM.



IX. DISCUSION

Debe mencionarse que el número de muestras de sangre a analizar no fue constante por región como se planificó, debido a varios inconvenientes para la obtención de las mismas, entre los cuales se menciona el escaso número de pacientes hospitalizados en algunos lugares, así como la negativa de los mismos y/o personas seleccionadas como posibles donadores.

Para las enzimas, en el caso de la ESD, se pone de manifiesto al observar los resultados una mayor frecuencia de aparición para el fenotipo 1 en todas las regiones estudiadas, siguiéndole el fenotipo 1-2, y por último, con la menor frecuencia, el fenotipo 2 con valores de frecuencia mínimos, por lo cual la posibilidad de que el fenotipo 2-1 fuera mayor es mínima debido a los valores muy bajos del fenotipo 2 que representa al alelo 2, que para poder conjugarse con el alelo 1 de valores elevados, pudiera provocar un mayor porcentaje del fenotipo 2-1.

En estudios realizados en poblaciones con distintas características raciales (blancos, negros, mexicanos, etc.) realizadas en Estados Unidos de Norte América, se presentan resultados similares a los obtenidos en este estudio, apareciendo en ellos un 1.9% para el fenotipo 2, siendo en este trabajo el porcentaje para dicho fenotipo de un 5% promedio de aparición,

probablemente por las mezclas raciales existentes en todas las regiones del país.

En los resultados también se observa un porcentaje mínimo de muestras sin actividad enzimática (2.27% en la región norte), lo cual es importante pues la literatura reporta la existencia de un alelo silencioso que es bastante raro entre la población y puede ser que a este alelo se deba la obtención de ese resultado.

Para la enzima FGM en las cinco regiones estudiadas prevalece el fenotipo 1 con más altos valores de porcentajes de aparición, siguiéndole el fenotipo 2-1 y con valores más bajos el fenotipo 2, presentando los resultados variación de región a región de hasta un 20% en valores de porcentajes. Esto puede deberse a las mezclas raciales existentes en el país y al tipo de muestreo realizado en el que se agrupó población por región y no por grupos étnicos que pudieran probablemente tener características fenotípicas distintas.

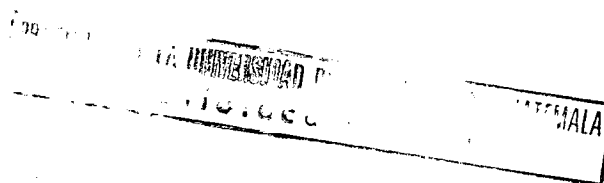
Para esta enzima aparece un porcentaje de casos indeterminados, es decir, aquellos que a pesar de repetir el análisis no fue posible tipificar la enzima, pues no se obtuvo diferenciación clara entre las bandas de aparición de los fenotipos de la misma.

Para la enzima GLO no se obtuvieron resultados de

tipificación de fenotipos. Se ensayó la metodología indicada y se introdujeron variaciones en cada uno de los pasos críticos del procedimiento, y ni aún los standards de sangre presentaron actividad clara y definida, pues se observaron bandas muy tenues e inidentificables, por lo que se presume que los reactivos donados para este procedimiento, no se encontraban en óptimas condiciones, además de influir la fácil degradación de esta enzima en las muestras de sangre seca.

X. CONCLUSIONES

- 1) Las enzimas marcadoras genéticas PGM y ESD, se manifiestan en la población guatemalteca en sus tres fenotipos: 1, 2-1 y 2;
- 2) Para la enzima ESD la frecuencia de aparición del fenotipo dominante en las cinco regiones es el 1, presentándose de manera descendente en valores de porcentajes el 2-1 y por último el fenotipo 2;
- 3) Para la enzima PGM la aparición del fenotipo dominante en las cinco regiones es el 1, presentándose con valores medios el 2-1, y con valores de porcentaje más bajo el fenotipo 2;
- 4) Los porcentajes de aparición de los fenotipos 2 en la enzima ESD son elevados en las cinco regiones de Guatemala respecto a los reportado por la literatura;
- 5) Los fenotipos de la ESD y de la PGM se distribuyen de forma constante en la población estudiada;
- 6) La enzima GIO no mostró actividad enzimática en las muestras de sangre analizadas. por lo que para esta enzima no se pudo comprobar la hipótesis planteada;



- 7) La hipótesis planteada no se cumple para las enzimas ESD y FGM, pues ambas presentan comportamientos similares en las frecuencias de aparición de los fenotipos en las cinco regiones estudiadas.

XI. RECOMENDACIONES

- 1) Efectuar el análisis individual de la enzima Glioxilasa I en la población guatemalteca, para obtener datos que permitan establecer comparaciones y completar así el estudio del grupo I de enzimas marcadoras genéticas.

- 2) Continuar el análisis en manchas de sangre de los otros grupos de enzimas marcadoras genéticas para poder obtener un perfil enzimático que individualize aún más la procedencia de dichas manchas;

- 3) Implementar el análisis de enzimas marcadoras genéticas en manchas de sangre en el área forense como análisis de rutina, para la diferenciación de individuos.

XII. REFERENCIAS

1. Gaennslen RE., et al., Background Material in Biochemistry Genetics and Immunology. p. 425-237. (In Sourcebook in Forensics Serology, Immunology and Biochemistry. New York: National Institute of Justice, 1983. 692 p.);
2. Charleston C., Why Polimorfism Occuur? p. 15-27. (In Proceeding of the Intenational Symposium on the Forensic Aplications of Electroforesis. Quantico, Virginia: U.S. Departament of Jusstice, 1984. 203 p.);
3. Merril GR., Genetics Forensics and Electrophoresis. p. 3-11. ((In Proceeding of the Intenational Symposium on the Forensic Aplications of Electroforesis. Quantico, Virginia: U.S. Departament of Jusstice, 1984.);
4. Gaennslen RE., et al., Use and Interpretation of Phenotypic Frequencies for Genetic Markers in Populations in Forensic Serology. p. 29-40. (In Sourcebook in Forensics Serology, Immunology and Biochemistry. New York: National Institute of Justice, 1983. 692 p.);
5. Leninger Al., Bioquímica., Las Bases Moelculares de la Estructura y función Celular, 2a. Ed., Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1985, XXIII - 1117 p. (p. 111-253);

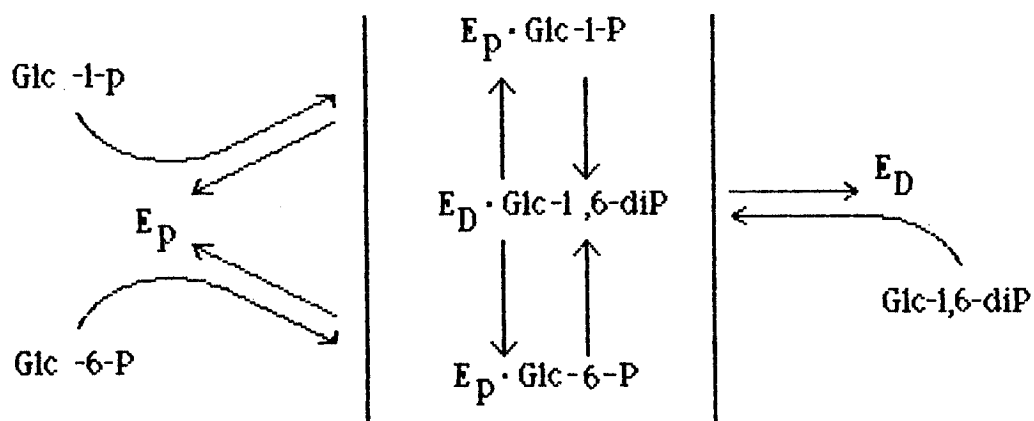
6. Reeder D., Standars for Forenssic Electrophoresis. . p. 79-84. (In Proceedings of the Forensic Aplications of Electrophoretic. Quantico, Virginia: U.S. Departament of Justice, 1984. 203 p.);
7. Fawcett J., Electrophoretic Theoty and Practice: Operations in Electrophoretic Analisis., p. 85-89. (In Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aplications of Electrophoretic. Quantico, Virginia: U.S. Departament of Justice, 1984. 203 p.);
8. Gaennsslen RE., Survey of Selected Methods. (In Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. New York: National Institute and Biochemestry, 1983. 27: 425-437;
9. Gaennsslen RE., Phosphoglucomutase, In: Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. 1983. 27: 425-437;
10. McAlpine PJ., Hopkinson DA., Harry H., The Relative Activities attributable to the three Phosphoglucomutase loci (PGM₁, PGM₂ y PGM₃). In Human Tissues. Ann. Hum. Genet. 1970., 34:169;
11. Spencer N., Hopkins Da., Harris H., Phosphoglucomutase

- Polymorphism in Man. Nature. 1964., 204:742;
12. Gounatis, AD., Horton HR., Koshland DE., The Phosphoglucosmutase reaction: Investigations of Enzyme Diphosphorylation during it's reaction with substrate. Biochimica et Biophysica acta., 1967., 132:41;
 13. Gannsslen RE., Glyoxilasa I, In: Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. 1983. 34:495-498;
 14. Bagster, IA. and C.W. PAar. 1975. Human eritrocito, Glioxilasa I Polymorfismo. J. Physiol. 256: 56-57 p.;
 15. Gannsslen RE., Esterasa, In: Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. 1983. 31: 463-475;
 16. Hayward JW., Bosworth AL., Cortner J., Esterase D Types in Human Bloodstains. J. Sci. Soc. 1975., 15: 289-291.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1:

Esquema para la reacción de la Fosfoglucomutasa (FGM).



donde:

E_P = Fosfoenzima;

E_D = Difosfoenzima;

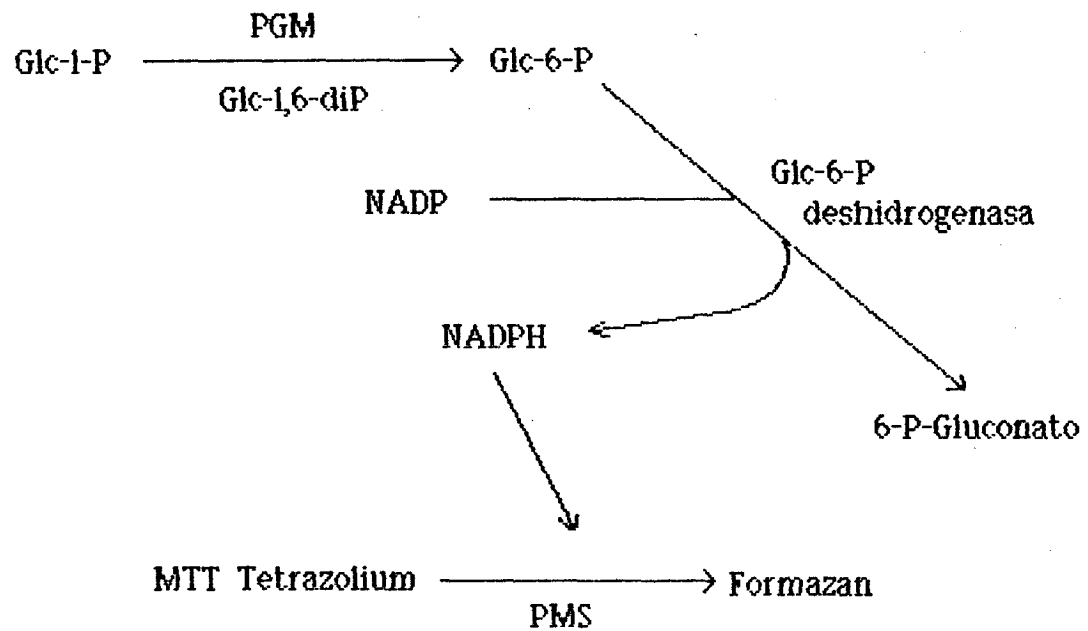
Glc = Glucosa;

P = Fosfato;

diP = Difosfato.

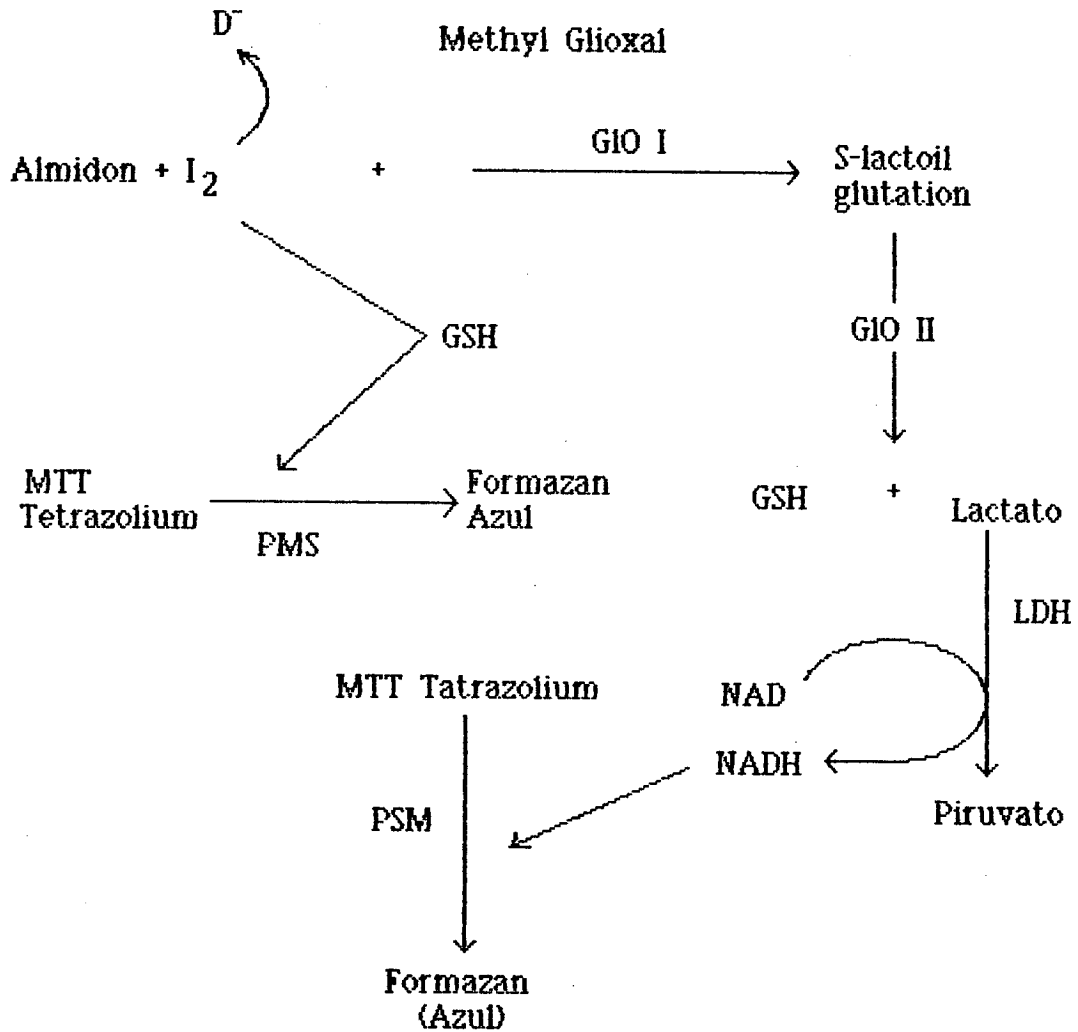
ANEXO 2:

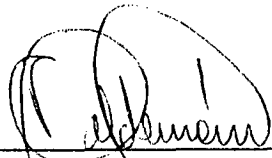
Detección de la Secuencia de Reacción para la Fosfoglucomutasa (PGM).



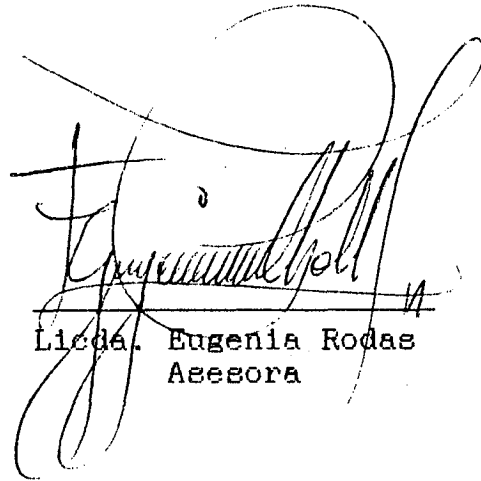
ANEXO 3:

Secuencia de Reacción de Detección para Glioxilasa 1 (GIO).

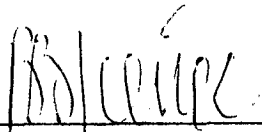




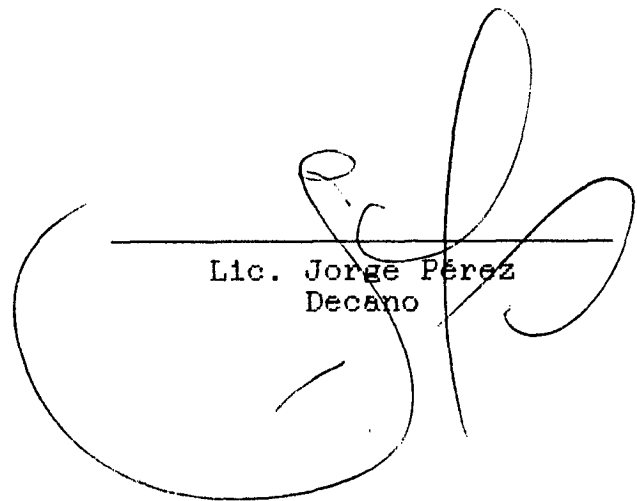
Br. Silvia Carolina Calderón Donis



Licda. Eugenia Rodas
Asesora



Licda. Beatriz Batres de Jiménez
Directora de Escuela



Lic. Jorge Pérez
Decano