

Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina

Palabras clave: Amelogenina, análisis molecular, género.

Key words: Amelogenin, molecular analysis, gender.

Abreviaturas:

AMELX= Gen de la amelogenina ubicado en el cromosoma X, AMELY= gen de la amelogenina ubicado en el cromosoma Y.

Recibido: 25/09/2007
Aceptado: 07/12/2007

Jesús Salvador Velarde-Félix,^{***} Claudia Elizabeth Molina-Benítez,^{**} Susana del Rocío Solórzano-Rosales,^{***} Silvestre Guadalupe Cázarez-Salazar,^{*} Horacio Rendón-Aguilar,^{*} Joel Murillo-Llanes,^{****} Juan José Ríos-Tostado^{*}

- ^{*} Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán.
- ^{**} Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa.
- ^{***} Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa.
- ^{****} Dpto. de Investigación del Hospital General de Culiacán.

Correspondencia:

Dr. Jesús Salvador Velarde Félix.

Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán «Bernardo J. Gastelum», Calle Juan Aldama esquina con Estado de Nayarit s/n Col. Rosales, CP. 80230, Culiacán, Sinaloa, México. Tel. 016677168560 (65) Ext. 196. E-mail:jsvelfe@hotmail.com

Resumen

La prueba de la amelogenina es usada frecuentemente en análisis forense para determinar el sexo de una persona. **Objetivo:** Conocer la eficacia de una prueba molecular no comercial para la determinación del género, basada en el análisis del gen de la amelogenina. **Material y métodos:** Estudio comparativo, observacional, transversal y ciego, en el cual 457 individuos hemodonadores decidieron participar; para ello proporcionaron 5 mL de sangre periférica de donde se obtuvo el material genético, mismo que se sometió a amplificación, mediante reacción en cadena de la polimerasa de una región del gen de la amelogenina ubicado en ambos cromosomas sexuales («AMELX» para el gen del cromosoma X y «AMELY» para el gen ubicado en el cromosoma Y). **Resultados:** De los individuos analizados, 239 fueron mujeres y 218 varones. Mediante el programa estadístico Epilnfo V6 comparamos nuestros resultados con los nombres y sexo de los participantes, observando una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 100%, así como también una concordancia de 100% y un coeficiente kappa de 1 ($p < 0.05$). **Conclusiones:** Por los resultados obtenidos, concluimos que esta prueba es altamente confiable al menos en esta población de México.

Abstract

Amelogenin test is often use as a forensic analyses for sex typing. **Objective:** Based in the amelogenin gene test, to demonstrate the efficacy of a non commercial molecular system for sex identification. **Material and methods.** A blind transversal, observational and comparative study. DNA was obtained from 457 blood donors wish to participate providing five milliliters of peripheral blood; these samples where amplified by Polymerase Chain Reaction of a region of the amelogenin gene, located in both sexual chromosomes («AMELX» for gene of X chromosome and «AMELY» for gene of Y chromosome). **Results:** 239 women and 218 men were screened; comparing our results with the participant's sex and names. Using Epilnfo V6 statistical program, we obtained a 100% of concordance, and 100% of sensibility, specificity and positive and negative predictive values, as well as kappa coefficient of 1 ($p > 0.05$). **Conclusions:** We conclude this test is highly reliable to this Mexican population for sex typing.

Introducción

A pesar de la existencia de los métodos tradicionales para la identificación del sexo en humanos, resulta necesario contar con pruebas alternativas que sean confiables, rápidas, económicas y aplicables en los distintos ámbitos del conocimiento y en diferentes tipos de muestras.

La amelogenina es la proteína de mayor concentración del esmalte dental durante el desarrollo, la cual en la maduración del mismo decrece para ser reemplazada por cristales de apatita.¹ Desde el punto de vista clínico, la deficiencia de amelogenina está relacionada con la amelogenénesis imperfecta, una enfermedad hereditaria que afecta la formación del esmalte dental.²

En el humano existen dos genes para esta proteína. Uno de ellos se localiza en el cromosoma Xp22.1-22.3, llamado «AMELX», que mide 2,872 pares de bases (pb) y el otro en el cromosoma Yp11.2, llamado «AMELY», de 3,272 pb.²

El análisis simultáneo de estos dos genes es de gran utilidad en la identificación del sexo. En este sentido, la prueba descrita por Sullivan y cols. detecta una delección de 6 pb del intrón 1 del gen AMELX, que genera productos de amplificación de 106 y de 112 pb para AMELY.³ Gracias a la amplificación de ambas regiones en un mismo tubo de reacción, el gen de la amelogenina ofrece la ventaja de tener al cromosoma X como control interno que siempre debe amplificar.⁴ Lo anterior es fundamental en distintas áreas del conocimiento tales como la investigación forense y clínica.

El propósito de este estudio es contar con una prueba confiable, económica y rápida para la determinación del género.

Material y métodos

Se realizó un estudio ciego, comparativo, observacional y transversal en el cual se analizaron 457 muestras de ADN de hemodonadores, de ambos sexos, nacidos y residentes en el estado de

Sinaloa, no emparentados, que acudieron al Banco de sangre del Hospital General de Culiacán «Dr. Bernardo J. Gastelum» y firmaron una carta de consentimiento informado.

El ADN genómico se obtuvo según el método descrito por Gustincich y cols,⁵ para luego verificar su calidad y cantidad mediante espectrofotometría. Posteriormente se amplificó un fragmento del gen de la amelogenina en un volumen de 25 μ L que contiene 2.5 U de Taq Polimerasa (marca Vivantis), 2 μ M de cada iniciador, cuya secuencia es:⁵ AMEL1: CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG y AMEL2: ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG, 200 μ M de deoxinucleósidos trifosfatados (dNTP's), 2.5 μ L de solución amortiguadora a una concentración 10X (1.5 mM de $MgCl_2$) y 50 ng de ADN genómico. Lo anterior se sometió a 35 ciclos de amplificación a 94 °C de desnaturalización, 60 °C de hibridación y 72 °C de polimerización (en un termociclador Marca Eppendorf Mastercycler).

En la figura 1 se observan los productos de amplificación (una banda de 112 pb para el gen AMELY y de 106 pb para el AMELX) y que fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración de 8%, corridos durante 3:30 horas y teñidos con nitra-

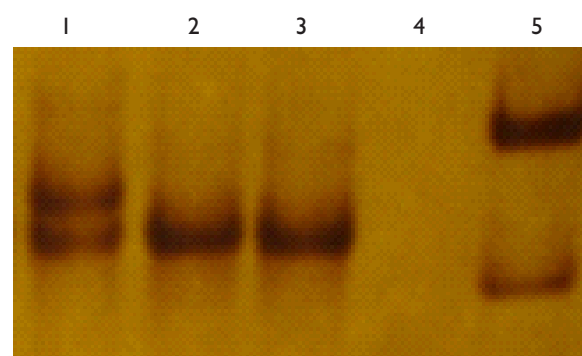


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 8% en el cual se observa en el carril 1 dos bandas: la de arriba de 116 pb y la de abajo de 112 pb (varón); en los carriles 2 y 3 una sola banda (mujer); carril 4 control negativo. Por último, en el carril 5 el marcador de peso molecular de 25 pb, donde la banda inferior corresponde a 100 pb y la superior a 125 pb.

to de plata. De tal forma que la presencia de una sola banda es indicativo de una mujer y dos bandas de un varón.

En caso de encontrar varones con resultado discordante, por la posible mutación en AMELY, sus ADN se someterían a una segunda ronda de amplificación con otros iniciadores del mismo gen para comprobar dicha mutación.⁶

De forma ciega se compararon los resultados del laboratorio con el nombre y sexo de cada participante, depositados en una base de datos misma que sirvió como estándar de oro y se determinaron sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos mediante tablas 2 x 2 y se calculó el coeficiente kappa mediante el programa estadístico Epilnfo V6.

Resultados

Se analizaron 457 muestras, de éstas 239 corresponden a mujeres (52.30%) y 218 a varones (47.70%). Al comparar los resultados del laboratorio con el nombre y sexo de los individuos participantes, depositados en la base de datos, encontramos que coinciden en 100% de los casos.

Al colocar los resultados en una tabla de 2 x 2 encontramos que el ensayo muestra una sensibilidad de 100% (IC95% 98 -100), especificidad de 100% (IC95% 98-100), valor predictivo positivo 100% (IC 95% 97-100) y valor predictivo negativo de 100% (IC95% 98 -100) y un coeficiente kappa de 1, $p < 0.05$.

Discusión

En este estudio nos propusimos implementar y validar una prueba de ADN que sea de utilidad en la determinación del género. La razón inicial por la que decidimos realizarlo fue el hecho de que en ocasiones es necesario conocer el sexo de la persona de la que se obtuvo una muestra, tal como en bebés con estados de intersexo, en donde existe incertidumbre en cuanto al sexo.

Diversos estudios han reportado una mutación de C por G en la región 3 donde se une el iniciador de reversa en el gen AMELY que interfiere y limita el uso de esta prueba, ocasionando que los varones sean identificados como mujeres.^{6,7} Entre ellos destaca uno realizado en la India, el cual reportó que la mutación se encuentra en 1.85% (5/270 varones),⁸ otro en Sri Lanka con una tasa de mutación de 8.33% (2/24 varones).⁹ Sin embargo, en Austria su frecuencia es muy baja, de tan sólo 0.02% (6/29,432 varones).⁹

El mestizaje de la población sinaloense con mayor tendencia a una herencia europea podría ser la causa de que no se encontrase tal mutación, lo cual redundaría en una alta eficacia de este ensayo. De tal forma que no fue necesario realizar una segunda ronda de amplificación con otros iniciadores del mismo gen con el objetivo de comprobar la existencia de dicha mutación.

Conclusiones

Por los resultados obtenidos, concluimos que este ensayo es confiable en población sinaloense. Así mismo, demostró ser sencillo, rápido y económico. Además de requerir cantidades mínimas de material genético.

Al menos en los individuos analizados no encontramos la mutación mencionada, y dado que ésta se ubica en el cromosoma Y, único en varones, nos hace suponer que nuestra ascendencia paterna procede más de Europa que del continente asiático. Sin embargo, es conveniente seguir analizando más individuos en aras de corroborar tal suposición.

Deseamos aclarar que el nombre y el sexo de los participantes, depositados en una base de datos, se cotejaron con los resultados del laboratorio, coincidiendo éstos en todos los casos. De allí que sea conveniente extrapolar esta prueba a situaciones reales y con otros tipos de muestras, tales como las encontradas en el campo forense o en el diagnóstico prenatal.

Después de realizar una búsqueda exhaustiva en la literatura nacional, concluimos que el nuestro es el primer trabajo realizado en nuestro país sobre la identificación del sexo por medio del gen de la amelogenina y que es importante reproducir este estudio en las diferentes regiones de México.

Referencias

1. Eastoe JE. The chemical composition of bone and teeth. *Adv Fluorine Res Dent Caries Prevent* 1965; 3: 5-17.
2. Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 127-133.
3. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test-fluorescence-based PCR analysis X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993; 15: 636-642.
4. Shadrach B, Commane M, Hren C, Warshawsky I. A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. *J Mol Diag* 2004; 6: 401-405.
5. Gustincich S, Carmici P, Del Sal G. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 1991; 11: 74.
6. Steinlechner M, Berger B, Niederstatter H, Parson W. Rare failures in the amelogenin sex test. *Int J Legal Med* 2002; 116: 117-120.
7. Roffey PE, Eckhoff CI, Kuhl JL. A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *J Forensic Sci* 2000; 45: 1016-1019.
8. Thangaraj K, Reddy AG, Singh L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int J Legal Med* 2002; 116: 121-123.
9. Brinkmann B. Is the amelogenin sex test valid? *Int J Legal Med* 2002; 116: 63.