

Hepatitis viral D

Se denomina así al virus delta (tipo ARN), que es una de las partículas orgánicas más pequeñas conocidas. Tiene la característica de depender de la presencia del virus B para sobrevivir, ya que utiliza su antígeno de superficie para cubrirse. Este virus en un inicio fue descrito en Italia en drogadictos y también en niños portadores crónicos del virus B nacidos de madres portadoras de virus B crónico. También ha sido encontrado en Latinoamérica, especialmente en aborígenes amazónicos. La forma de atacarlo será la prevención del virus de hepatitis B. En

Costa Rica hemos encontrado solo un caso con anticuerpo delta en un portador crónico de virus B.

Hepatitis viral E

Se denominaba anteriormente a este virus tipo No A No B de tipo epidémico. Ese tipo ARN, se ha presentado en brotes epidémicos que se creían debidos al virus A. Han sido descritos brotes en Asia, África y México. Una de sus características es el alto riesgo de enfermedad fulminante en embarazadas. Otra característica que lo semeja al virus A es la ausencia de enfermedad crónica.

Hepatitis viral F

El virus identificado con esta letra se caracteriza por tener un período de incubación corto. Se presenta principalmente en hemofílicos y en pacientes con anemia aplásica. Se han descrito también hepatitis fulminantes asociadas con él.

Como todos hemos visto las letras y los virus continúan. Es nuestro deber ambientarnos con ellos y tratar hasta donde se pueda de ponerle letra a cualquier hepatitis viral que nos corresponda atender o bien referirlo a un centro especializado para que se nos ayude con la serología y control del paciente.

LA HUELLA GENÉTICA (LA TECNOLOGÍA DEL ADN)

RAFAEL MARÍN ROJAS *

INTRODUCCIÓN

El término huella digital genética fue acuñado por A. J. Jeffrys en Inglaterra, a fines de la década pasada. Este investigador utilizó sondas multilocus y obtuvo un patrón de bandas de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) semejante al patrón magnético que traen los productos comerciales. Como ese patrón es característico de cada persona se le llamó huella digital genética en concordancia con la huella dactilar, que también es única.

Sin embargo, las sondas multilocus (MLP) cedieron pronto el lugar a las sondas unilocus (SLP) que dan solo un patrón de 2 bandas por persona. Aunque las sondas múltiples tienen una mayor capacidad de exclusión, su producción e interpretación de los resultados presentan varias dificultades que no se dan con las sondas simples. Una mezcla de 2-4 de éstas nos dan resultados más claros y equivalentes a una sonda múltiple.

La gran capacidad de exclusión e inclusive de inclusión de esta nueva tecnología se debe a que existen zonas (locus) en el ADN que son muy variables. Estas se denominan, una vez cortadas enzimáticamente, RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism). Su longitud está dada por el mayor o menor número de veces que una unidad básica de ADN se repite dentro de ese locus: VNTR (Variable Number of Tandem Repeats). Cada uno de los tamaños de ese fragmento constituye un alelo del locus.

Para efectos forenses, el locus será más importante cuanto más alelos tenga. En la actualidad se trabajan algunos loci que tienen entre 20 y 30 alelos, tales como el MCT-118 (D1580) y el APO B. Recientemente, un locus relacionado con los antígenos H. L. A. (DRB) se describió con 60 alelos. Como heredamos un gen materno y otro paterno, el número posible de patrones de dos bandas se hace enorme y cuando se combinan las capa-

idades de exclusión de dos o más locus podríamos tener una probabilidad tal que, estadísticamente, no alcanzaría la población de un país o inclusive la población mundial, para encontrar otro individuo semejante.

Es por ello que tenemos un gran empeño en utilizar rutinariamente esa tecnología en Costa Rica, la cual se puede utilizar con sangre fresca (patemidades), y manchas de sangre, semen o cabellos foliculados generalmente hallados en homicidios y violaciones.

TERMINOLOGÍA:

Como ocurre en la aparición de cualquier nueva tecnología, en este campo se utilizan una serie de términos "nuevos" pero que pronto serán de uso rutinario en los estrados judiciales y policiales. Aquí se definen.

ADN: molécula base de la vida, con capacidad de autorreplicarse. Unidades básicas: nucleótidos; cada uno formado

* Máster en Ciencias, Jefe Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

por una base púrica o pirimídica, un fosfato y un azúcar llamado desoxirribosa (Pentosa). Bases: Adenina, Timina, Citosina y Guanina. Diversidad biológica dada por secuencia de bases en cadena del ADN. Este está configurado por dos cadenas de nucleótidos que se enrollan sobre sí mismos formando una especie de escalera en caracol. Peldaños formados por la unión de las bases de ambas cadenas, una frente a otra; siempre adenina unida con timina, y citosina con guanina.

Locus: fracción del ADN que codifica una característica.

VNTR: repetición secuencial de una unidad básica de ADN, dentro del RFLP.

RFLP: fragmento de ADN de longitud (y peso) variable o polimórfica, limitado por dos sitios de restricción.

Enzima de restricción: molécula orgánica capaz de cortar la molécula del ADN en pequeños pedazos o RFLPs por sus dos extremos o sitios de restricción. Es una verdadera "tijera genética". **Enzima polimerasa:** hace lo contrario: une nucleótidos para formar un pedazo de ADN (oligonucleótido), tomando como punto de partida un "primer" (cebo o semilla).

"Primer": oligonucleótido cuya secuencia de bases es conocida y hecha con el propósito de que se pegue o hibridice solo el locus (VNTR) que interesa.

Sonda: equivalente de un primer grande. Su misión es encontrar al RFLPs dentro de los miles que produce una enzima de restricción. Pegado a ella lleva un sistema que sirve para revelar la presencia de ese RFLP e indicar su posición relativa. Este sistema es necesario porque el ADN del RFLP está en poca concentración y no es posible visualizarlo directamente, se usa el sistema revelador de la sonda: radiactivo, químico o fotoquímico.

Agarosa: sustancia natural, gelificante, extraída de algas, semejante a la gelatina. En ella ponemos la muestra de ADN digerida con la enzima (RFLPs) para separar por electroforesis.

Electroforesis: técnica para someter a un campo eléctrico la muestra que está en la agarosa. Los RFLPs más livianos migrarán, dentro del gel, más rápidamente que los más grandes o pesados y

todos ocuparán una posición característica que será visualizada y fotografiada.

Transferir (Southern Blotting): pasar los RFLPs, después de la electroforesis, de la agarosa a un medio sólido: nylon o celulosa. En este nuevo soporte es donde se hibridiza con la sonda marcada.

Revelar: poner a funcionar el sistema indicador, transportado por la sonda, para que indique el sitio exacto donde quedaron las bandas "paterna" y "materna" de los RFLPs analizados. Una vez revelados son fotografiados para su estudio comparativo, con las otras muestras.

METODOLOGÍA:

En resumen, la técnica de la huella genética consiste en extraer el ADN de la muestra: sangre fresca, tejido, mancha de sangre, manchas de semen o folículo piloso. La extracción se realiza mediante un método orgánico o uno inorgánico.

Después de extraído, el ADN se somete a la digestión con la enzima de restricción.

Una vez realizada la digestión, los RFLPs se separan mediante electroforesis en agarosa, después de lo cual se realiza la transferencia a membranas de nylon. Ya en este soporte se lleva a cabo la hibridización con la sonda marcada para finalizar con el revelado y la fotografía.

Como podrá verse, la metodología es larga y bastante complicada por lo que se han diseñado técnicas alternativas a la huella genética. La más utilizada el PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Mediante ella hacemos millones de copias del VNTR que nos interesa (con primers y polimerasa) y con esa cantidad podemos visualizar directamente la posición del fragmento del ADN, después de la electroforesis, sin necesidad de transferencia ni sondeo. Con ello la metodología se reduce a una etapa de extracción, a otra de copiado y a la separación por electroforesis. Por último, fotografiamos las posiciones relativas de los RFLPs directamente de la agarosa, mediante tinción directa.

Dada su ventaja, en cuanto a tiempo de trabajo y a que las sondas son muy difíciles de conseguir, porque están muy protegidas con patentes, optamos por utilizar al PCR como técnica a aplicar en el trabajo forense rutinario.

LA TECNOLOGÍA DEL ADN EN COSTA RICA

Para fines forenses iniciamos el desarrollo de esta tecnología hace unos tres años, poco tiempo después de que el Dr. Jeffrys la aplicara para estos menesteres en Inglaterra. Obtuvimos una excelente acogida de los señores Magistrados y de nuestros superiores inmediatos. Sin embargo, la escasez de recursos del Organismo de Investigación Judicial impidió la adquisición de los materiales, reactivos y equipo de forma inmediata y hubo necesidad de programar su compra en varios años para concluir a fines de 1992.

A pesar de ello no nos esperamos todo ese tiempo para iniciar el desarrollo de esa tecnología. Mediante aporte personal conseguí los libros, el material científico didáctico y algunos reactivos, lo cual facilitó el desarrollo de las etapas en forma secuencial. Ello nos permitió concluir la última etapa del proceso solo 15 días después de poner a operar el último aparato que nos llegó en enero de 1993.

Resta ahora la conclusión de la reestructuración física del laboratorio para que a fines del presente año estemos aplicando rutinariamente esta técnica en los casos de paternidad discutida, aunque con el análisis de un solo locus. Un año después de esto pretendemos estudiar el número de locus necesarios para que la técnica tenga conclusión afirmativa, en cuanto a la paternidad y a los delitos ya citados. Para esto último es necesario una base de datos que nos permita establecer las frecuencias alélicas de los diferentes loci a utilizar. Se pretende realizar este arduo estudio con un aporte del CONICIT para lo cual la Corte Plena ya dio su visto bueno.

BIBLIOGRAFÍA

1. ERLICH, H. A.: *PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, N. Y., 1989.
2. INNIS, M.A. et al: *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., California, 1990.
3. KIRBY, L.T.: *DNA Fingerprinting, An Introduction*. W. H. Freeman and Company, New York, 1992.
4. WATSON, J. D. et al: *Molecular Biology of the Gene*. Fourth Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, California, 1987.