UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS CARRERA BIOQUÍMICA

SELADIS



EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ADN HUMANO, A PARTIR DE DIFERENTES TEJIDOS BIOLÓGICOS, POR MEDIO DE KITS COMERCIALES Y MÉTODO CONVENCIONAL

Postulante:

Marisol Jackeline Molina Gutiérrez

Asesora:

Dra. Susana Revollo Zepita Ph.D.

Tesina presentado para optar al título de Licenciatura en Bioquímica

> LA PAZ – BOLIVIA 2006

DEDICATORIA

Dedica este trabaja a Dios por darme vida y entendimiento, y que en su infinita bondad me brinda maravillosas oportunidades en la vida.

A mis queridos padres Emilio Molina Alarcón, y Martha Gutiérrez Bernal, a mis hermanos del alma Jhemis e Sván, y a mi hermosa hija Andreita.

A mi asesora Dra. Susana Revollo Zepila, por transmitirme un valioso conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Dra. Susana Revollo, un agradecimiento de manera muy especial por su dinamismo, sus consejos y su gran apoyo en la culminación del presente trabajo.

Al señor David Licona de la empresa **OBERON**, representantes de **SIGMA** - **ALDRICH** en Bolivia, por otorgarnos gentilmente los kits comerciales y lograr la elaboración del presente trabajo.

A mi papitos Emilio y Martha quienes siempre me apoyaron y confiaron en mi, porque a ellos les debo lo que soy, son mi voz de aliento para mi superación como persona y el pilar fundamental de mi familia.

A mis queridos hermanos Ghemis e Sván por su s sabios y acertados consejos a lo largo de mi vida. A mi hermosa hija Andreita quien es mi razón de vivir.

A los señores Tribunales Dr. Giovanni García, Dr. Bernardo Forrico por sus indicaciones, correcciones y apoyo en la culminación de mi lesina.

Al Dr. Jorge Nogales por su ayuda y apoyo en la defensa de mi lesina.

A Raquiel Orliz, Viviana Peralta, Marcos Conde por su amistad y colaboración desinteresada en la culminación de mi trabajo.

A Carla Poppe, Noelia Rendón, Fanny Cardozo, Jacqueline Rodríguez, David Rocabado, Lourdes Plata, Daniela Negrie, Patricia Rosales, Fanny Del Castillo por la linda amistad que nos une y su apoyo incondicional.

A Jhonny Alarcón, Gaely Borras, Faliana Kerrera por el gran apoyo que me brindaron en lodo momento.

A todos mis Docentes y compañeros de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés quienes fueron parte fundamental de mi formación académica.

A los Docentes, Administrativos y compañeros del Instituto SELADIS, quienes me apoyaron durante el Internado.

RESUMEN

El uso de la tecnología del ADN es la herramienta más importante y poderosa de

la humanidad, el cual en los últimos años ha tenido una extensa aplicación para

resolver objetivamente situaciones como violaciones, paternidad, identificación

biológica de individuos y hechos delictivos.

En el presente trabajo se ha pretendido evaluar métodos de aislamiento de ADN

humano a partir de diferentes tejidos biológicos y muestras conservadas de

distinta manera, por medio de kits comerciales y método convencional.

Se han estudiado 3 tejidos diferentes: sangre, tejido epitelial, tejido piloso

recolectadas tanto en tubo como en papel filtro. Se ha utilizado un kit comercial

para sangre (Blood PCR Kit)) y un kit comercial para tejidos (Tissue PCR Kit).

Además se ha procedido a aislar el ADN de las mismas muestras por el método

enzimático convencional.

En el aislamiento de ADN humano por medio de kits comerciales se obtuvo

mejores resultados en cuanto a la calidad y cantidad de ADN observado en los

geles de agarosa en relación al método convencional, y por otro lado, una óptima

obtención de perfiles genéticos a través del análisis de repeticiones cortas en

tándem (STR's) por secuenciación manual en geles de poliacrilmida.

Palabras claves: Aislamiento de ADN; Kits comerciales, perfiles genéticos

humanos

RESUMEN

1.	INTR	ODUCO	CIÓN	1		
2.	ANTI	ECEDEI	NTES	2		
	2.1.	ACIDO	D DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)	2		
2.1.1. Clases de ADN						
	2.2.	EL DN	IA MITOCONDRIAL HUMANO Y SU EXPRESIÓN	5		
2.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS CON VISTAS AL A ISLAMIENTO DEL						
	2.2.1	. MUES	STRAS DE SANGRE	8		
	2.	2.1.1.	Composición	8		
	2.	2.1.2.	Recogida	8		
	2.	2.1.3.	Sangre líquida	8		
	2.	2.1.4.	Mancha de sangre sobre superficies absorbentes	9		
	2.	2.1.5.	Mancha de sangre sobre superficies no absorbentes	10		
	2.2.2	. MUES	STRAS DE SALIVA	11		
	2.	2.2.1.	Composición	11		
	2.	2.2.2.	Recogida	11		
	2.2.3. MUESTRAS DE PELOS					
	2.	2.3.1.	Composición	13		
	2.	2.3.2.	Recogida	15		
2.3	3. A	ISLAMI	ENTO DE ADN: FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA	16		
2.4	ł. R	EACCIÓ	ÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	17		
2.5	5. P	OLIMOF	RFISMOS STR	28		
	2.5.1	. Polimo	orfismos microsatélite	28		
	2.5.2	. STRs	simples	29		
	2.5.3	. STRs	simples con alelos sin consenso	29		
	2.5.4	. STRs	compuestos	29		
	2.5.5	. STRs	compuestos con alelos sin consenso	29		
	2.5.6	. STRs	complejos	30		

3.	OBJETIVOS					
	3.2.	Objetivo	General	31		
	3.3.	Objetivos	s Específicos	31		
4.	D	ISEÑO ME	TODOLÓGICO	32		
	4.1.	Flujograr	ma	32		
	4.2.	Obtenció	on de muestras	33		
	4.	2.1. Hisop	oado bucal	33		
	4.	2.2. Saliva	a	33		
		4.2.2.1.	Obtención de saliva en fresco	33		
		4.2.2.2.	Obtención de saliva en papel	33		
	4.	2.3. Cabe	llos	34		
	4.	2.4. Sang	re	34		
		4.2.4.1.	Obtención de Sangre Líquida:	34		
		4.2.4.2.	Obtención de Sangre seca en Papel:	34		
	4.3.	Aislamie	nto de ADN	35		
	4.	3.1. Aislaı	miento de ADN con Kit comercial	35		
	4.	3.2. Aislaı	miento de ADN por método convencional	36		
	4.4.	Cualifica	ción de ADN	36		
	4.5.	EVALUA	CIÓN DEL ADN AISLADO	37		
	4.5.1. Amplificación de ADN por PCR – STR's					
	4.	5.2. Elect	roforesis en Geles de Poliacrilamida	41		
		4.5.2.1.	Preparación de los geles	41		
		4.5.2.	1.1. Armado de los vidrios	41		
		4.5.2.2.	Preparación del gel	41		
		4.5.2.3.	Sembrado de Amplicones en el gel de poliacrilamida	42		
		4.5.2.4.	Revelado del gel	43		

5.	RESULTADOS						
	5.1. Electroforesis de ADN aislado en gel de Agarosa						
5.2. AMPLIFICACIÓN EN GEL DE POLIACRILAMIDA							
	5.	2.1. KITS	COMERCIALES	47			
		5.2.1.1.	KIT PARA TEJIDOS Y MÉTODO CONVENCIONAL	47			
		5.2.1.2.	PERFILES GENÉTICOS ENCONTRADOS:	48			
		5.2.1.3.	KIT PARA SANGRE Y MÉTODO CONVENCIONAL	49			
	6. DISCUSIONES						
	9. ANEXOS						



1. INTRODUCCIÓN

El uso de la tecnología del ADN en la solución de problemas sociales y legales tiene un impacto y aplicación relevante en América Latina y el mundo entero. La violencia y conflictividad de la sociedad en la región, las estructuras familiares débiles y frecuentes disputas de paternidad y parentesco, generan situaciones que requieren la identificación biológica de los individuos como soporte para la administración de justicia.

En general, cualquier tipo de muestra biológica es analizable en el laboratorio. La mayor parte del material genético de los organismos superiores se halla dentro de las células que lo forman, concretamente en un compartimento llamado núcleo, aislado del resto de la célula y protegido por la membrana nuclear. Cada parte de nuestro cuerpo, cada tejido, cada órgano, está formado por diferentes tipos de células especializadas en funciones concretas.

La amplia experiencia y profundidad del desempeño de los investigadores en la aplicación de técnicas modernas de la biología y genética forense, hacen que el manejo del ADN sea más frecuente, sencillo y con menor complejidad. Por esta razón, los sistemas judiciales, demandan con mayor frecuencia la ayuda de las pruebas del ADN para la disolución de hechos delictivos.

Las tecnologías moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han facilitado el acceso de muchos laboratorios a participar en el mapeo genético y la identificación forense, incluso en países en vías de desarrollo. La PCR permite analizar cantidades muy pequeñas de ADN, por lo que aún minúsculas muestras de material biológico aportan evidencias de identidad. Además, los alelos de los microsatélites son de tamaño pequeño, por lo que es posible analizar ADNs degradados, en contraste con los minisatélites con alelos más grandes.

El presente trabajo pretende evaluar los diferentes métodos de aislamiento de ADN humano a partir de diferentes tejidos biológicos y muestras conservadas



de diferente manera, con las ventajas de utilizar mínimas cantidades de muestra, utilizar métodos sencillos, eficaces y a un costo reducido.

2. ANTECEDENTES

2.1. ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

El ácido desoxirribonucleico (polímero de unidades menores denominados nucleótidos) junto con el ácido ribonucleico, constituye la porción prostética de los nucleoproteidos, cuyo nombre tiene un contexto histórico, ya que se descubrieron en el núcleo de la célula. Se trata de una molécula de gran peso molecular (macromolécula) que está constituida por tres sustancias distintas: ácido fosfórico, un monosacárido aldehídico del tipo pentosa (la desoxirribosa), y una base nitrogenada cíclica que puede ser púrica (adenina o citosina) o pirimidínica (timina o guanina).

La unión de la base nitrogenada (citosina, adenina, guanina o timina) con la pentosa (desoxirribosa) forma un nucleósido; éste, uniéndose al ácido fosfórico, nos da un nucleótido; la unión de los nucleótidos entre sí en enlace diester nos da el polinucleótido, en este caso el ácido desoxirribonucleico. Las bases nitrogenadas se hallan en relación molecular 1:1, la relación adenina + timina / guanina + citosina es de valor constante para cada especie animal.

Estructuralmente la molécula de ADN se presenta en forma de dos cadenas helicoidales arrolladas alrededor de un mismo eje (imaginario); las cadenas están unidas entre sí por las bases que la hacen en pares. Los apareamientos son siempre adenina-timina y citosina-guanina.¹

La estructura se mantiene estable gracias al apilamiento de las bases en el centro de la molécula (Ilustración 1). Las dos hebras que forman la cadena

¹ Alvarado zink, A. et al., "El ADN, a 50 años del descubrimiento de su estructura. La domesticación de las especies", Correo del Maestro, julio 2003, pp 86.



presentan orientaciones opuestas y pueden separarse mediante la acción del calor o de determinadas sustancias químicas (por ejemplo la urea), dando lugar al proceso llamado desnaturalización, que es reversible, es decir, permite recuperar la estructura helicoidal (renaturalización). La temperatura a la que la molécula de ADN se desnaturaliza es distinta en cada especie de organismo.

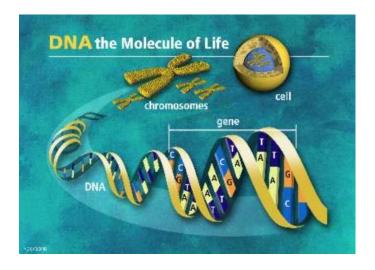


Ilustración 1: Estructura del ADN

El ADN es el soporte físico que contiene toda la información genética de un organismo, definiéndose como gen cada una de las porciones de su molécula que se pueden traducir en una proteína. El orden en que se presentan las cuatro bases es el que determina el código genético.

La función principal del ADN es mantener a través de un sistema de claves (código genético) la información necesaria para que las células hijas sean idénticas a las progenitoras (información genética). Este proceso se almacena en la secuencia de las bases (aparentemente aleatoria), que tiene una disposición que es copiada al ARNm (traducción) para que en el ribosoma sintetice determinada proteína. Este proceso es también denominado "dogma central de la biología molecular". Por medio de los mecanismos de recombinación y mutaciones se obtienen las variaciones necesarias para adaptaciones y evoluciones.



2.1.1. Clases de ADN

El ADN es por lo común el constituyente básico de la cromatina (cromosoma) nuclear en las células eucarióticas, pero también existe en pequeña cantidad en las mitocondrias y cloroplastos. En los procariontes forma el nucloide (que a diferencia de los eucariontes no va asociado a proteínas, es desnudo) y en los virus (DNAvirus) que lo poseen constituyen el virión o elemento infestante. Por lo común su estructura tridimensional posee giro hacia la derecha (ß-ADN, dextrógiro) que es la forma más estable y ocasionalmente posee giro hacia la izquierda (z-ADN, levógiro) Acorde a las evidencias, sólo una pequeña parte del ADN constituye genes (menos del 10 %).

Existen diferentes tipos que los podemos dividir en:

- ADN de copia única (el 57 % del total) formados por segmentos de aproximadamente 1000 pares de nucleótidos del longitud, una pequeña parte de este ADN contiene los genes.
- ADN repetitivo (20 %) son unidades de aproximadamente 300 pares de nucleótidos que se repiten en el genoma unas 10⁵ veces (unidades de repetición). Se intercalan con el ADN de copia única.
- ADN satélite (altamente repetitivo: 28 %) son unidades cortas de pares de nucleótidos que se repiten en el genoma. Son característicos en cada especie y pueden ser separados por centrifugación. Constituyen la heterocromatina y no se le conoce función.

El ADN expresivo o codificante, a pesar de ser el más interesante desde el punto de vista médico, posee poca variabilidad entre las personas, con excepción de ciertas regiones, como la que informa para el sistema HLA. El resto del ADN, hasta el 80-95%, se ha denominado "Basura" ("junk"), porque no es transcripto a ARN y no codifica para ningún gen en particular, aunque parece poseer otras funciones biológicas muy importantes. Curiosamente,



este ADN no expresivo, es injustamente denominado "basura", es tremendamente polimórfico y variable entre los individuos, por lo que posee una utilidad extraordinaria en Medicina Legal. Además tiene la ventaja de representar, como se ha visto, la mayor parte del genoma humano, por lo que se ha convertido en una gran fuente de marcadores genéticos.

Se estima que aproximadamente la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo y, aunque gran parte del mismo es extremadamente polimórfico por diversos motivos, el ADN más utilizado con fines forenses hasta la fecha es el ADN repetido en tándem y, dentro de él el ADN minisatélite y microsatélite.

La variabilidad genética observable en el ADN de los distintos individuos se puede investigar experimentalmente por diversos procedimientos. En Genética Forense los más habituales pueden clasificarse en dos grandes grupos desde una perspectiva histórica. Estos son: procedimientos clásicos o de análisis por sondas multilocus (MLP) y unilocus (SLP). (DNA fingerprinting y DNA Profiling respectivamente) y procedimientos basados en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.²

2.2. EL DNA MITOCONDRIAL HUMANO Y SU EXPRESIÓN

Las células humanas contienen aproximadamente de 5 a 6 pg de ADN, gran parte del cual es ADN nuclear. Sólo el 1% del total de ADN es ADN mitocondrial. Por tanto, las mitocondrias son orgánulos celulares con su propio material hereditario.

El ADN mitocondrial tiene relación con diversas enfermedades y procesos degenerativos. La molécula de ADN mitocondrial ha sido de gran ayuda para los antropólogos moleculares, pues a través de ella han aprendido más sobre filogenia y evolución. Se ha utilizado para establecer el linaje de todos los

² Beyer, R., María Emilia, "Gen o no gen", Lectorum, México, 2002. pp 32



humanos en África hace 200.00 años, para estudiar animales extinguidos ³, o para estudio de otros restos antiguos como huesos humanos de hace 5500 años ⁴.

En el campo forense, el ADNmt ha sido también de gran utilidad por presentar secuencias polimórficas y por presentarse en las células en mayor cantidad que el ADN nuclear ⁵. El número de moléculas de ADNmt por célula es difícil de determinar, pues depende del tipo celular y del momento funcional, pero como norma general las mitocondrias contienen de dos a diez copias de ADN por mitocondria. Además, el hecho de que el ADNmt sea circular es una razón para suponer una elevada estabilidad de la molécula contra las exonucleasas durante la degradación por putrefacción ⁶.

Por otro lado, la puesta a punto de procedimientos automáticos para la secuenciación ha permitido que el análisis de secuencia sea una técnica rutinaria en muchos laboratorios ⁷.

La mitocondria tuvo en el pasado un interés restringido a los estudiosos de la citología, la bioquímica metabólica y la bioenergética. Sin embargo, desde hace pocos años la mitocondria humana se encuentra en un primer plano de la actualidad de las ciencias biomédicas. Este cambio radical se fundamenta en varios hechos:

³ Thomas RH, Schaffner W, Wilson AC, Pääbo S. (1989). "DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf". Nature 340: pp 465-467.

⁴ Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. (1989). "Ancient bone amplified". Nature 342: pp 485

⁵ Rath DS y Merril CR, (1989). *"Mitochondrial DNA and its forensic potential"*. Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis, FBI Forensic Science Research and Training Center: Quantico, VA, pp 113.

⁶ Szibor R, Michael M, Spitsyn VA, Plate I, Ginter EK, Krause D, (1997). "Mitochondrial D-loop 3' (CA)n repeat polymorphism: optimization of análisis and population data". Electrophoresis 18: pp 2857-2860.

⁷ Hunkapiller T, Kaise RJ, Koop BF, Hood L, (1991). *"Large-scale and automated DNA sequence determination"*. Science 254: pp 59-67



- a) El conocimiento de un numeroso grupo de enfermedades genéticas metabólicas, entre las cuales figuran más de medio centenar debidas a mutaciones puntuales consistentes en la sustitución de unas bases por otras, afectando a distintos genes del genoma mitocondrial. A ello hay que añadir los varios cientos de mutaciones no puntuales como son reordenaciones genéticas del tipo de las delecciones o las inserciones de fragmentos de DNA de distinto tamaño. Este aspecto de la mitocondria humana ha llamado la atención de los científicos interesados en la terapia génica.
- b) La utilidad del DNA mitocondrial como un marcador de gran fiabilidad en antropología molecular para el estudio de la evolución humana, los flujos migratorios, etc. Utilidad que se extiende a la ciencia forense, por su valor como marcador en la identificación de personas o el esclarecimiento de relaciones de parentesco.
- c) La bioquímica metabólica ha acrecentado los conocimientos sobre el papel central de la mitocondria en el metabolismo celular. Al mismo tiempo se han clarificado definitivamente los aspectos bioenergéticos de la mitocondria en relación con el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el necesario acoplamiento de ambos procesos.
- d) Nuevos aspectos que prometen ser decisivos son su participación en el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Su interés creciente en oncología se debe a su papel central en la apoptosis o suicidio celular, que impide en condiciones normales el desarrollo de tumores.



2.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS CON VISTAS AL AISLAMIENTO DEL ADN

2.2.1. MUESTRAS DE SANGRE

2.2.1.1. Composición.

Los componentes celulares mayoritarios en el tejido sanguíneo son los eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíes) y los leucocitos (glóbulos blancos). Los primeros son células maduras especializadas en el transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina. Su citoplasma está ocupado totalmente por esta proteína de transporte y por ello son células que han perdido el núcleo y los orgánulos celulares. No presentan núcleo y por tanto no contienen ADN nuclear. Sin embargo, la sangre resulta ser una adecuada fuente de ADN por encontrarse en ella, aunque en menor número, otras células nucleadas, los leucocitos. De este tipo celular es de dónde lograremos extraer el ADN de las muestras de sangre. La cantidad estimada de ADN en sangre completa es de 30-60 µg/mL. 8

2.2.1.2. Recogida

La sangre se puede encontrar en diferentes estados: líquida o en forma de mancha. El aspecto de las manchas de sangre varía con la antigüedad y el soporte sobre el que se encuentran. Como norma general, cuanto más antigua es una mancha de sangre más oscuro es su color, pero siempre son las condiciones ambientales (microclima), las que determinan el aspecto de la mancha. Las condiciones de envío de las muestras de sangre varían según el estado en que se encuentre.

2.2.1.3. Sangre líquida

Se necesita 5 ml de sangre en un tubo perfectamente etiquetado que contenga anticoagulante (EDTA). En la etiqueta debe constar al menos la

⁸ Kobilinsky L (1992). "Recovery and stability of DNA in samples of forensic science significance". Forensic Science Review Vol. 4 N° 1: pp 68-87.



fecha, la localidad, el nombre completo del sujeto al que se le extrajo la sangre y el número de caso o de diligencias.

Además es aconsejable disponer de contenedores aptos para introducir los tubos y evitar así su rotura. La sangre en forma de mancha se conserva mejor que en su estado líquido cuando no hay posibilidad de refrigerarla. Con una única gota de sangre sobre la gasa sería suficiente pero varias gotas permitirán repetir el experimento en caso de que algo falle durante el proceso de análisis. A partir de 10 μ L de sangre completa, que en buen estado contiene unas 7000-8000 células blancas por μ L, se pueden aislar aproximadamente 500 η g de ADN, aunque siempre depende de la eficacia del aislamiento.

2.2.1.4. Mancha de sangre sobre superficies absorbentes:

Si tuviéramos una prenda de vestir manchada, aunque sólo fuera una pequeña parte (el cuello o el puño de una camisa) se enviará la prenda completa al Laboratorio (Ilustración 2); pero si la prenda u objeto fuera suficientemente grande (un sofá, un colchón), se recortará la zona manchada dejando un margen de uno o dos centímetros. En los tejidos claros las manchas presentan un color rojo oscuro que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. En los tejidos oscuros las manchas se visualizan mal y las encontraremos sólo por el tacto acartonado que confieren a la tela. Es aconsejable mandar la prenda bien seca y en bolsa de papel, ya que si se envía húmeda y en bolsa de plástico el proceso de putrefacción se acelera. La muestra se puede dejar secar a temperatura ambiente y evitando su exposición al sol. A veces resulta más difícil obtener resultados en la analítica de manchas con abundante sangre, en las cuales el secado ha sido lento e incompleto, que en pequeñas manchas de sangre donde el secado se ha producido rápida y totalmente, y no ha dado tiempo a que actúen los procesos de descomposición.



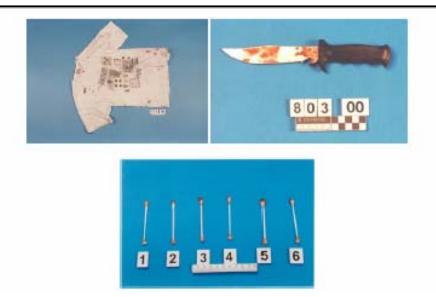


Ilustración 2:

Manchas de sangre: izquierda arriba: Prenda con diversas manchas de sangre; derecha arriba: machete con diversas manchas de sangre en mango y hoja; abajo: Torundas de algodón impregnados en suero y utilizados para recoger muestras de sangre.

2.2.1.5. Mancha de sangre sobre superficies no absorbentes:

Cuando la mancha se encuentra sobre una superficie no absorbente forma costras con aspecto de escamas brillantes o agujas (Ilustración 2); en manchas recientes las escamas son rojas aunque el color depende más bien del grosor de la costra (a menor espesor el rojo es más acusado); con la antigüedad las costras se van haciendo más oscuras. Si el objeto manchado fuera pequeño se enviará directamente, pero si no fuera posible (pared, suelo, mesa) se dejará secar la mancha si aún estuviera húmeda y se procederá al raspado y recogida de las costras en un sobre de papel. Se adjuntará una descripción de dónde fue hallada con esquemas o fotografías si fueran necesarias.

Antiguamente se realizaba una técnica denominada transplante de Taylor para recoger estas muestras. Este se efectúa poniendo un papel filtro sobre



la mancha y aplicando una gota de suero salino isotónico (9g. de CINa en 1 litro de agua) sobre la mancha; se espera a que se seque y se repite el proceso hasta que toda la mancha pase al papel. El proceso es tedioso y largo, por lo que es más práctico recoger la mancha con una torunda (bastoncillo de limpieza de oídos) de algodón ligeramente humedecida con suero salino isotónico (Ilustración 2). Debe usarse una torunda por mancha y si la mancha es muy grande se puede usar más de una. Dichas torundas deben dejarse secar a temperatura ambiente y se remiten en sobres de manera individual indicando perfectamente dónde fueron recogidas.

2.2.2. MUESTRAS DE SALIVA

2.2.2.1. Composición

La secreción salival del hombre varía entre 1 y 1,5 litros diarios. Tiene una función lubricante y facilitadora de la masticación y la deglución; asimismo posee una función enzimática desdoblando los glúcidos (amilasa). Durante la noche casi deja de segregarse. La saliva en sí, no es un fluido que contenga componente celular y por ello carece por sí misma de ADN; pero se encuentra en un medio lleno de células epiteliales (epitelio bucal). Estas células se desprenden continuamente y llegan a formar parte de la saliva. Así, un chicle puede contener células del epitelio bucal que son nucleadas y por tanto contienen ADN; en un filtro de cigarrillo nos podemos encontrar células adheridas a él que se han desprendido del epitelio labial.

2.2.2.2. Recogida

Las muestras de saliva suelen presentarse en su mayoría en forma de manchas. Se asientan normalmente sobre filtros de cigarrillo, chicles, cepillos de dientes, sobres y sellos. Para su recogida es fundamental la manipulación con pinzas evitando en todo momento el contacto directo con las manos. Otras veces, la saliva asienta sobre vasos y latas de bebida; en este caso se ha de recoger la muestra pasando por la zona donde presumiblemente se



apoyaron los labios un hisopo impregnado en suero salino, como si de una muestra de sangre se tratase. También es frecuente el análisis en pasamontañas, medias o mascarillas utilizadas en atracos y robos con la finalidad de ocultar el rostro, recortándose, en estos casos, la zona que aproximadamente coincide con la boca para proceder a su estudio (Ilustración 3).

En caso de varias muestras se deberán enviar separadas; por ejemplo, los filtros que hay en un cenicero se deben mandar uno a uno, en sobres separados, y prescindiendo de los restos de ceniza que puedan quedar en el cenicero.



Ilustración 3: Recolección de manchas de saliva

Hoy en día es cada vez más frecuente el uso de saliva recogida en un hisopo como muestra biológica indubitada (de referencia) pues, en contraposición con la extracción de sangre, resulta un método no invasivo, no doloroso y además se evita el peligro de vertido o rotura de los tubos de sangre líquida tradicionales. Para su recogida se ha de frotar el hisopo limpio de algodón contra la cara interna de las mejillas con el fin de arrastrar el mayor número de células del epitelio bucal.

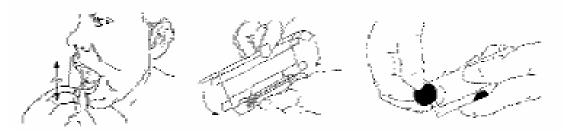


Ilustración 4: Esquema de recogida de muestra indubitada.



Posteriormente se deja secar el hisopo a temperatura ambiente sin que incida directamente la luz solar sobre él y una vez seco puede introducirse en una caja de cartón o sobre de papel, evitando siempre los contenedores de plástico (Ilustración 4). Este tipo de muestras no necesita refrigeración, lo cual es un motivo más para preferir su uso en lugar de las muestras de sangre. Como en los casos anteriores los hisopos de saliva deben ir acompañados de etiquetas identificativas.

2.2.3. MUESTRAS DE PELOS

2.2.3.1. Composición

El pelo es una formación queratinizante derivada de la epidermis. Está formado por un extremo libre y por una raíz que termina en un ensanchamiento (bulbo) implantado en la dermis. La estructura íntima del pelo está formada por tres capas concéntricas:

- La **cutícula** es una envoltura formada por un número variable de capas de células dependiendo del grosor del pelo.
- La **corteza** está formada por células corticales que contienen macrofibrillas de queratina y gránulos de melanina. Esta capa constituye la mayor parte del pelo y contribuye principalmente a establecer las propiedades mecánicas de éste.
- La **médula** representa la parte central y puede ser continua, discontinua o inexistente. Está formada por una trama de queratina esponjosa en la que se sustentan laminillas de material amorfo que llenan los espacios vacíos.

Los pelos son estructuras que muestran diferente composición según la zona que estudiemos. Se trata de un tejido vivo que se va queratinizando a medida que crece. La parte más alejada del cuero cabelludo está formada por células que tienen ocupado su citoplasma totalmente por una proteína estructural llamada queratina que da su forma al pelo. Por tanto, en esta zona distal, las



células carecen de núcleo y de ADN. Sin embargo, en la zona proximal (bulbo o raíz), el pelo presenta células nucleadas totalmente activas que contienen ADN. Pero no todos los pelos con bulbo son susceptibles de análisis de ADN nuclear, por lo que es necesario realizar una selección previa a la analítica molecular, simplemente visualizándolos al microscopio. Dentro del conjunto de pelos que tengan bulbo existen algunos que son mejores que otros para los estudios de ADN. Los pelos que aún se encuentran en fase de crecimiento presentan bulbo activo rico en células y por ello son idóneos para los estudios de ADN. Los pelos caducos no presentan tal actividad y por ello no se obtienen resultados positivos en la analítica.

Se pueden diferenciar tres fases en la vida de un pelo: anagénica (fase de crecimiento y elevada actividad celular), catagénica (fase de madurez con moderada actividad celular) y telogénica (fase terminal sin actividad celular).

Lógicamente, los pelos idóneos para el análisis de ADN son los anagénicos, seguidos de los catagénicos. Como norma general, los telogénicos se desecharan si se pretende realizar un estudio de ADN nuclear, pero no si el estudio es de ADN mitocondrial.

El pelo anagénico que puede aparecer en la escena de un crimen normalmente ha sido arrancado. Es fácil identificarlos con el microscopio pues presentan bulbo en forma de cuchara, o de botón o de abanico; muchas veces el bulbo está retorcido y la zona del tallo próxima a él presenta una cubierta epitelial (manguito).

El pelo telogénico puede haber sido arrancado, pero lo normal es que se caiga espontáneamente. Presenta bulbo en forma de palillo de tambor y no suele aparecer la cubierta epitelial.

⁹ Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggman U, Comey T, Dirnhofer R. (1991). "Identification of unknown human remains: amplification and typing of DNA extracted from compact bone tissue". J. Forensic Sci. 36: pp 1649-1661



Finalmente, el pelo catagénico presenta un estadío intermedio entre el primero y el segundo. Es difícil discriminar qué pelos en estado catagénico darán resultados positivos en la extracción de ADN y cuáles no lo harán; por ello, recomendamos que se intente la analítica de ADN en todos ellos.

2.2.3.2. **Recogida**

En la escena del crimen puede haber pelos del criminal o de la víctima, pero también de curiosos que contaminaron el lugar de los hechos. Por ello hay que ser rigurosos a la hora de elegir qué pelos se enviarán al Laboratorio, pues no todos los pelos presentes en el lugar de los hechos tienen la misma importancia. Por ejemplo, si el delito ha ocurrido en un local público es innecesario recoger todos los pelos que puedan estar presentes en el lugar; se ha de realizar una selección y centrarse sobre todo en pelos que la víctima pueda tener en las manos por ejemplo.

Los inconvenientes de este tipo de muestra son su poco peso y en ocasiones su escaso tamaño, lo cual dificulta su transporte y localización. Por ello, la manipulación del material se realizará con el máximo cuidado, preferiblemente se usarán guantes y se evitarán las pinzas, pues pueden ocasionar la fragmentación del pelo. Dichas muestras pueden enviarse en bolsas de plástico herméticamente cerradas, en frascos de cristal o en los típicos frascos de toma de muestra de orina, como siempre etiquetados.

Deben tomarse muestras de pelo control en la víctima, preferiblemente arrancándolos para que conserven su bulbo o raíz; pero si los estudios a realizar son análisis de polimorfismos de ADN nuclear no es necesario que la muestra control de la víctima sea también un grupo de pelos, sino que puede ser sangre o saliva.



2.3. AISLAMIENTO DE ADN: FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA.

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos, es necesario previamente aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares. Consideramos que el aislamiento de ADN es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de los ácidos nucleicos. Durante este proceso existe gran cantidad de sustancias que interfieren provenientes tanto de los propios reactivos del aislamiento como de los soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas de interés criminalístico. Es conveniente obtener una buena cantidad de ADN cuando la muestra lo permite y que éste se encuentre lo más limpio y puro posible, libre de contaminantes como proteínas básicas, ARN, carbohidratos, etc., que pueden bloquear la acción del tratamiento al que someteremos a dicho ADN. Por ejemplo, las proteínas básicas pueden inhibir la entrada de ADN en el gel de electroforesis. 10 11

En el método convencional se usa una enzima proteolítica acompañada de un detergente iónico como SDS. La enzima que habitualmente se usa es la proteinasa K, pues se inactiva fácilmente por calor para evitar que interfiera en la reacción de amplificación. La digestión es un paso fundamental del proceso, pues es necesaria la lisis de las proteínas para el aislamiento de ADN. En este punto pueden interferir ciertas sustancias que inhiben esta lisis y no permiten el acceso a la molécula genética. Otro problema de este paso es que el SDS es un fuerte inhibidor de la enzima Taq polimerasa que se utiliza durante la PCR, por lo que será necesario realizar un paso de purificación para retirarlo¹².

¹⁰ Hochmeister MN, Op Cit pp 1649-1661

¹¹ Higuchi R., von Beroldingen C., Sensabaugh G. F., Erlich H. (1988). "DNA typing from single hairs". Nature 332: pp 543-546

¹² Higuchi R. (1989). "Simple and rapid preparation of samples for PCR". En: PCR technology. Principles and applications for DNA technology. Erlich HA ed. Nueva York: Stockton press, pp.: 31-43



La precipitación del ADN con etanol en presencia de sales (por ejemplo Acetato Sódico) y a bajas temperaturas, mediante centrifugación, el ADN precipitado formará un sedimento en el fondo del tubo; retiraremos todo el sobrenadante y dejaremos secar el sedimento para que se evapore el etanol y finalmente lo resuspenderemos en tampón que nos sea más útil con la finalidad de tenerlo en disolución listo para su estudio.

Con este método se logra retirar las proteínas y otros componentes celulares separándolos de los ácidos nucleicos. El ADN así obtenido es de doble hebra.

2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En la mayoría de los casos, la estrategia a seguir en el estudio de ADN procedente de restos forenses consiste en extraer el material genético y posteriormente someterlo a una amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN de cualquier origen (procedente de virus, bacterias, plantas, animales o humanos) y se basa en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN conocida ¹³, ¹⁴. Se trata de una reacción especialmente valiosa por su alta especificidad, su fácil automatización, y por su capacidad de amplificar pequeñísimas cantidades de muestra. Por todo esto ha tenido un gran impacto en campos como la medicina clínica, el diagnóstico de enfermedades genéticas, la biología evolutiva y por supuesto, la biología forense.

Además, esta técnica ha permitido introducir el estudio de los marcadores de ADN, los cuales presentan un contenido polimórfico sin precedentes en relación con los polimorfismos de marcadores proteicos que se solían utilizar

¹³ Mullis K. B., Faloona F. (1987). "Specific synthesis of DNA in Vitro polymerase catalyzed chain reaction". Meth. Enzymol. 155: 335-350

¹⁴ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi RH, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science 239 :pp 487-491



en los estudios de identificación. Se pueden estudiar un gran número de marcadores hipervariables incluso en una única reacción.

Las bases teóricas de la PCR no son complicadas. El fragmento de ADN a amplificar está delimitado por dos fragmentos cortos de ADN o cebadores ("primers") que se sintetizan químicamente. Estos cebadores son complementarios con las secuencias de bases que flanquean el fragmento a estudiar. Los cebadores inician en el tubo de ensayo una amplificación que se continúa en ciclos sucesivos. En cada ciclo se duplica el número de copias de la secuencia deseada, respecto al ciclo anterior.

Cada ciclo comienza con la separación de las dos cadenas de ADN molde. Posteriormente los dos cebadores se sitúan en sus respectivas secuencias diana complementarias, una de cada cadena. Una enzima, la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que no se altera a elevadas temperaturas, agrega entonces bases en los extremos de los cebadores, alargando las dobles hélices que el cebador había iniciado ¹⁵. Como cada cadena produce una nueva hélice doble, se duplica en cada ciclo la secuencia de ADN deseada.

El primer ciclo de síntesis produce nuevas cadenas hijas de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los "primers". En el segundo ciclo de síntesis, estas cadenas hijas sirven como nuevos moldes y, en este caso, los fragmentos resultantes ya no tendrán una longitud indefinida, sino que su tamaño estará delimitado por los "primers" de la reacción. Las nuevas cadenas hijas formadas servirán de molde para sucesivos ciclos de síntesis.

La evolución de la técnica ha permitido hacer la reacción cada vez más sencilla y eficaz. Los primeros procedimientos de PCR se realizaban

¹⁵ Ruano G, Pagliaro EM, Schwartz TR, Lamy K, Messina D, Gaensslen RE y Lee HC, (1992). "Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis". Biotechniques13 (2): pp 266-274



manualmente con calor húmedo en baños con la temperatura prefijada; hoy en día se realiza de forma automática en un termociclador. Se trata de un aparato compacto que consta de un bloque térmico cuya temperatura va variando según el plan de datos introducido por el usuario y en cuyo interior se depositan las muestras. El aparato está provisto de un termostato que produce oscilaciones constantes y cíclicas de la temperatura rápidamente. Esta automatización ha permitido mejorar mucho el rendimiento y la reproducibilidad de los experimentos.

Cada ciclo transcurre con los siguientes cambios (ver Ilustración 9 e Ilustración 10):

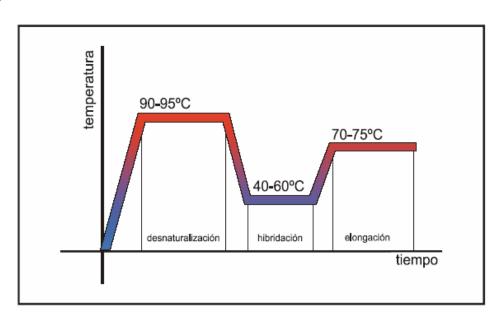


Ilustración 9: Gráfico que representa las variaciones de temperatura de cada ciclo PCR

1°.- Fase de desnaturalización a 90°C-95°C: se produce la separación (desnaturalización) de las hebras de nuestro ADN molde también llamado "template". La temperatura a la cual se alcanza dicha desnaturalización depende de la composición de bases de la doble hélice, siendo necesarias temperaturas más elevadas cuanto mayor número de pares de bases del tipo



G-C contenga la molécula ¹⁶. Esto se debe al hecho de que la Guanina y la Citosina se unen mediante tres puentes de hidrógeno mientras que la Adenina y la Timina lo hacen mediante dos por lo que resulta lógico pensar que costará más separar pares G-C que pares A-T y por ello serán necesarias mayores temperaturas en el primer caso.

- 2º.- Fase de apareamiento o hibridación ("annealing") de 40 a 60°C: se colocan los cebadores o "primers" en las zonas complementarias de la hebra molde. Sin este apareamiento inicial de los cebadores no puede comenzar a trabajar la polimerasa. La temperatura a la que transcurre el "annealing" es específica de la secuencia y longitud del cebador y se determina experimentalmente, aunque existen algunos métodos que pueden ayudarnos a la elección de la temperatura de annealing antes de realizar el experimento. La elección de la temperatura en este paso es un parámetro crítico pues si es demasiado alta no se producirá anillamiento y no habrá amplificación y si es demasiado baja se incrementará el anillamiento inespecífico y aparecerán productos no deseados (si el extremo 3' de un primer se anilla en cualquier lugar del molde, aunque el resto del "primer" no se anille específicamente, el oligo será elongado).
- 3°.- Fase de elongación o extensión a 70-75°C: con los cebadores apareados, la polimerasa comienza a sintetizar la hebra complementaria mediante la adición al extremo 3'OH de desoxinucleótidos libres disponibles en la mezcla de reacción (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), de tal forma que el crecimiento de la nueva hebra se realiza en sentido 5' → 3'. El orden o secuencia de los nucleótidos de la hebra "hija" viene determinada por el orden de la hebra "madre", basándose en las reglas de complementariedad (Adeninas siempre apareadas con Timinas y Citosinas con Guaninas). La temperatura más comúnmente usada son 72°C pues se encuentra cerca de la

¹⁶ Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi RH, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science 239: pp 487-491



temperatura óptima de actuación de la Taq polimerasa (75°C), pero la elongación suele comenzar ya durante el anillamiento, pues a 55°C la Taq es parcialmente activa.

Cada una de estas fases requiere un tiempo mínimo para ser efectiva.

Este tiempo mínimo se determina de manera empírica y es conveniente no alargarlo para evitar el riesgo de envejecimiento de la enzima. Suele oscilar entre 30 segundos y varios minutos según la fase en la cual nos encontremos.

- 1°.- Fase de desnaturalización: un tiempo de 30-60 segundos a 94°C suele ser suficiente para obtener buenos productos de PCR. Si prolongamos el tiempo de desnaturalización, aumentaremos el tiempo al cual la enzima está sometida a elevadas temperaturas y por ello se incrementará el porcentaje de moléculas de Taq convencional que pierden su actividad. De cualquier manera, el tiempo de desnaturalización debe incrementarse si el ADN molde tiene un contenido elevado de pares GC.
- 2°.- **Fase de apareamiento:** para la mayoría de las reacciones PCR es suficiente un tiempo de 30-60 segundos en la fase de anillamiento.
- 3°.- Fase de elongación: El tiempo de incubación para la elongación varía según la longitud del fragmento que queramos amplificar pues la actividad de la Taq polimerasa a temperatura óptima suele ser de 2000 nucleótidos incorporados por minuto; el tiempo de extensión en la reacción, por tanto, se puede calcular de acuerdo con la actividad de la enzima (desde unos 20 segundos para fragmentos de menos de 500 pares de bases, 40 segundos para unos 1200 pares de bases, hasta varios minutos para fragmentos de varias Kilobases).



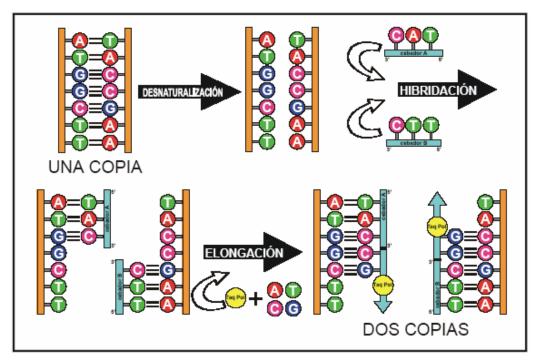


Ilustración 19: Desarrollo de un ciclo de PCR.

Lo mismo ocurre con el número de ciclos de PCR, se determina de manera empírica y oscila entre 20 y 35. Si interesa obtener una mayor cantidad de producto amplificado se puede aumentar este parámetro, pero se ha de tener en cuenta que dicho aumento irá en detrimento de la calidad, es decir, aparecerán más errores en las nuevas moléculas debido al empobrecimiento de la reacción.

Antes del comienzo de los ciclos es conveniente realizar un paso único de desnaturalización largo (5 minutos a 93-96°C) para asegurar que el ADN molde se desnaturaliza totalmente aunque sea muy largo. Y al final de los ciclos se suele añadir un paso único de elongación largo (5-15 minutos a 72°C) para que se termine la formación de los productos PCR generados durante la reacción.



Componentes de un PCR. Funciones:

- Los cebadores cuya función es señalar la zona concreta a multiplicar y aportar un extremo 3'-OH libre para que la polimerasa pueda empezar a actuar. En general se recomienda que el tamaño de los oligos se encuentre entre 20 y 30 nucleótidos. Una mayor longitud ayudará a obtener una mayor especificidad. Su concentración recomendada oscila entre 0,1 y 0,5 μM. Una concentración demasiado elevada puede producir inespecificidad en el alineamiento mientras que si hay escasez puede producirse el agotamiento antes del fin de la reacción, perdiendo así rendimiento.
- Nucleótidos sueltos (dNTPs) que formarán las nuevas cadenas de ADN y que siempre se añadirán a la reacción manteniendo la misma concentración final de cada uno de ellos para evitar errores en el proceso de copia del ADN molde. La cantidad de dNTPs a utilizar en la reacción dependerá de la longitud del fragmento a amplificar y se suelen añadir en exceso pero, como veremos, los dNTPs reducen el Cl2Mg libre y por ello no debe incrementarse demasiado su concentración final. La concentración final de cada dNTP para el buen funcionamiento de la Taq polimerasa suele ser de 200 μM, a una concentración de Cl2Mg de 1.5 mM. En un volumen total de reacción de 25 μL, teóricamente estos nucleótidos permiten la síntesis de aproximadamente 6-6.5 μg de ADN, cantidad suficiente para reacciones de un solo locus ("singleplex") o de varios loci a la vez ("multiplex").
- Una enzima ADN polimerasa, en este caso termoestable, que lleve a cabo todo el proceso. En los inicios de los procesos de PCR se utilizaba como enzima el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de la bacteria *E. Coli.* Esto presentaba el inconveniente de que dicha enzima se inactivaba con el calor durante la desnaturalización, lo cual obligaba a añadir más enzima después de cada ciclo. La sustitución de



ésta enzima por la DNA polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (de ahí el nombre de *Taq* polimerasa) supuso un enorme avance pues se evita así el engorroso proceso de tener que estar pendiente continuamente del proceso PCR 17 ya que la enzima es estable a elevadas temperaturas. Además, el uso de esta nueva enzima ha permitido incrementar las temperaturas de alineamiento de los cebadores con el ADN, lo cual mejora de forma significativa la astringencia de la reacción y, en definitiva, la especificidad de los productos. La enzima consta de una sola cadena polipeptídica de 95 kDa, es muy activa en su función polimerasa $5' \rightarrow 3'$ y carece de actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$. Un paso inicial en la PCR de 9-12 minutos a 94-95°C ("Hot Start PCR") produce su activación disminuyendo así la formación de productos inespecíficos. La cantidad de enzima recomendada habitualmente es de 1 - 2 Unidades para un volumen de reacción de 25 μL

- El Mg₂₊ es un factor indispensable en las reacciones PCR porque actúa como cofactor de la enzima Taq polimerasa. Se suele añadir a la mezcla de reacción en forma de Cl₂Mg y forma complejos solubles con los dNTPs para producir el sustrato real que la enzima reconoce. La concentración óptima varía entre 0,5 mM hasta 5 mM y la concentración real libre en la reacción depende de la concentración de compuestos capaces de unirse al Cl₂Mg, como los dNTPs, el pirofosfato libre y el EDTA.
- Tubos especiales capaces de transmitir los cambios de temperatura a la muestra con la misma rapidez y cuyas paredes son más finas de lo normal. Se ha de tener en cuenta además que el calentamiento de la muestra a altas temperaturas induce a su evaporación, por lo que es conveniente añadir una capa de aceite mineral en la parte superior,

¹⁷ Kwok S., Higuchi R. (1989). "Avoiding false positives with PCR". Nature 339: pp 237-238



aunque actualmente existen termocicladores que ya incorporan una cubierta caliente en el bloque que impide la acumulación de la solución en la parte superior del tubo.

El resultado es la amplificación de un producto génico un número determinado de veces. Como los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como molde en el siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo.

Así pues, después de 20 ciclos, la PCR rinde 2²⁰ copias (ver Ilustración 11). Para amplificaciones que no presentan "a priori" problemas se recomiendan 28-30 ciclos, pero este número se puede aumentar si el rendimiento de la PCR es bajo debido por ejemplo a la escasa cantidad de ADN molde.

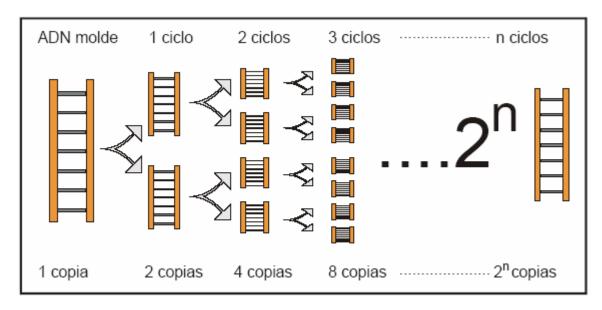


Ilustración 11: Desarrollo de una reacción PCR de n ciclos.

Resumiendo, la técnica descrita es extraordinariamente sensible, es posible teóricamente generar miles de millones de copias a partir de una molécula de ADN. Una o muy pocas moléculas de ADN intactas que sobrevivan en un tejido pueden amplificarse por PCR.

La exquisita sensibilidad de la PCR puede ser a veces un inconveniente. Cualquier fragmento de ADN exógeno a la muestra que caiga en el



experimento será amplificado si lleva secuencias que puedan ser reconocidas por los cebadores, con lo que se pueden obtener falsos positivos ¹⁸. Existen varias fuentes potenciales de contaminación:

- a) Contaminación con ADN humano procedente del ambiente de trabajo.
- b) Contaminación mediante ADN de origen bacteriano o fúngico procedente incluso de la propia muestra a analizar, que si bien no se espera que anille con los cebadores por tratarse de ADN no humano, sí puede interferir en la reacción disminuyendo el rendimiento de la misma.
- c) Contaminación cruzada de unas muestras a otras durante la preparación de las mismas. Este hecho es habitual cuando se procesa un gran número de muestras a la vez por la gran atención que se requiere durante un tiempo más o menos largo.

La fuente de contaminación más peligrosa es la que se conoce como "carryover" de productos de amplificación y ocurre cuando un ADN ya amplificado
contamina a una muestra que todavía no ha sido amplificada. El producto PCR
contaminante sirve como molde ideal para amplificaciones posteriores y
obtendremos así resultados erróneos. Este tipo de contaminación puede
suceder bien de forma directa, o bien indirecta como con aerosoles de una
punta de pipeta sin filtro por ejemplo.

Todos estos problemas han obligado a establecer procedimientos que aseguren una buena calidad en el análisis de las muestras entre los que podemos destacar:

26

¹⁸ Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991). "DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats". Am. J. Hum. Genet. 49: pp 746-756





Ilustración 12: Disposición del Laboratorio

- Separación física en el laboratorio del área de extracción del ADN y preparación de la reacción PCR y el área de manipulación del producto amplificado (ver Ilustración 12).
- Uso de guantes desechables cambiándolos frecuentemente.
- Uso de reactivos de buena calidad libre de nucleasas y autoclavados, siendo recomendable que cada operario mantenga su propio material de PCR de forma que resulte más fácil controlar las contaminaciones.
- Cerrar siempre los tubos que contiene la muestra, los reactivos y las cajas que contienen las puntas de pipeta mientras no se estén usando.
- Uso de puntas con filtro desechables estériles utilizando una punta para cada muestra.
- Centrifugar los tubos brevemente antes de abrirlos para evitar la dispersión de pequeñas gotitas de la muestra en el área de trabajo.
- No procesar un elevado número de muestras a la vez ni durante la extracción ni durante la amplificación.



 Incluir muestras control en cada amplificación de forma que podamos detectar la presencia de cualquier contaminante.

2.5. POLIMORFISMOS STR

La mayoría de nuestro ADN es idéntico al de otras personas. Sin embargo, hay regiones heredadas de nuestro ADN que pueden variar de una a otra persona. Las variaciones de la secuencia del ADN entre individuos se denominan "polimorfismos". Como descubriremos en esta actividad, las secuencias con grado máximo de polimorfismo son muy útiles para el análisis de ADN en casos de medicina legal y en pruebas de paternidad. Esta actividad se basa en analizar la herencia de un tipo de polimorfismos de ADN conocido como "repeticiones cortas en tándem" o, de forma abreviada, STR (del inglés *Short Tandem Repeats*).

Las STR son secuencias cortas de ADN, normalmente con una longitud de 2 a 5 pares de bases, que se repiten muchas veces de forma consecutiva, cabeza con cola; por ejemplo, la secuencia de 16 pb "gatagatagatagatagata" representaría 4 copias dispuestas cabeza con cola del tetrámero "gata". Los polimorfismos en STR se deben al distinto número de copias del elemento repetido que puede aparecer en una población de individuos.

2.5.1. Polimorfismos microsatélite

La unidad de repetición o core consta de 2-7 nucleótidos y son más pequeños que los minisatélites pues cuentan con alelos de un tamaño aproximado de 80-400 pb. Asimismo, el número de repeticiones puede ser diferente entre los dos cromosomas homólogos de un mismo individuo ¹⁹. Según el número de pares de bases que presenten en la unidad repetitiva se clasifican en: dinucleótidos, con dos pb en cada core (son los más abundantes), trinucleótidos, con tres pb en cada core, tetranucleótidos, con cuatro pb en

¹⁹ Hauge XY, Litt M (1993). "A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphism by the PCR". Hum. Mol. Genet. 2 pp. 411-415



cada core, pentanucleótidos, con cinco, etc. Los dinucleótidos presentan el inconveniente de que cuando se analizan aparecen artefactos de amplificación minoritarios (llamados "shadow bands" o picos "sttuter") debidos al mecanismo de "slippage" de la enzima polimerasa ²⁰. Los STRs tetraméricos presentan este problema de manera mucho más atenuada y los artefactos de amplificación suelen ser bandas que se identifican fácilmente y que presentan una unidad de repetición menos que el alelo real. Como en el caso de los polimorfismos minisatélite, en los microsatélites también pueden existir microvariaciones en la secuencia de la unidad de repetición. Según este tipo de variaciones podemos clasificar los STRs en ²¹:

2.5.2. STRs simples

Son polimorfismos que contienen repeticiones con unidades idénticas en longitud y secuencia.

2.5.3. STRs simples con alelos sin consenso

Se trata de STRs simples pero alguno de sus alelos presenta alguna unidad de repetición incompleta.

2.5.4. STRs compuestos

Son polimorfismos que comprenden dos o más tipos de unidades de repetición adyacentes, con diferente secuencia.

2.5.5. STRs compuestos con alelos sin consenso

Son polimorfismos compuestos pero con alelos que presentan alguna unidad de repetición incompleta.

²⁰ Urquhart A, Kimptom CP, Downes TJ, Gill P, (1994). "Variation in Short Tandem Repeat sequencesa survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers". Int. J. Leg. Med. 107: pp 13-20

²¹ Möller A. Meyer E, Brinkmann B (1994). "Different types of structural variation in STRs: HUMFES/FPS, HUMVWA and HUMD21S11". Int. J. Leg. Med. 108: pp 165-166



2.5.6. STRs complejos

Son polimorfismos que presentan varios bloques de repetición con unidades de longitud variable con otras secuencias intercaladas más o menos variables.

Es importante puntualizar que revisando la literatura podemos encontrarnos que para un mismo locus del tipo STR simple aparecen descritas dos unidades de repetición diferentes.

La sensibilidad de estos marcadores que permite el análisis incluso en muestras de ADN degradado, la estabilidad, la facilidad de la determinación del tamaño de los alelos, la reproducibilidad y la posibilidad de realizar el análisis de varios marcadores en un solo tubo evitándose así un gasto de reactivos y de tiempo son algunos de los parámetros que han hecho que los STRs sean los polimorfismos elegidos por los laboratorios de identificación.



3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo General

 Evaluar métodos de aislamiento de ADN humano, a partir de sangre líquida, sangre fresca en papel, saliva fresca, saliva seca en papel, cabello con bulbo e hisopado bucal, por medio de Kits comerciales (kit para tejidos, kit para sangre) y método convencional.

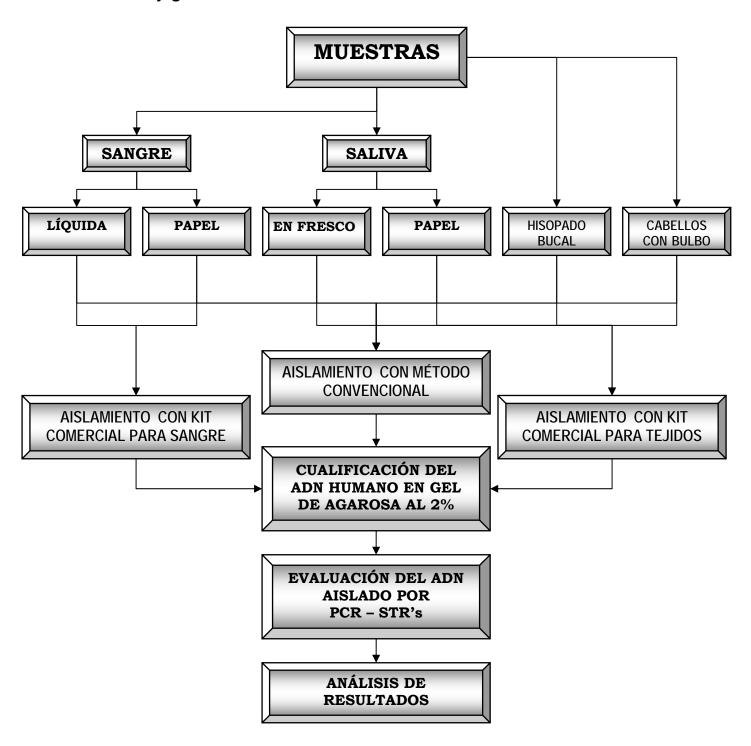
3.3. Objetivos Específicos

- Evaluar el aislamiento y amplificación de ADN humano a partir de muestras provenientes de tejidos biológicos con el método de kit comercial para tejidos y kit comercial para sangre.
- Comparar de manera cualitativa los diferentes tejidos biológicos por los métodos de aislamiento convencional y de Kits comerciales.
- Evaluar la calidad de ADN aislado por los diferentes métodos a través de la determinación de perfiles genéticos humanos por el método PCR- STRs



4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Flujograma





4.2. Obtención de muestras

Se manipularon diferentes muestras de tejidos biológicos: hisopado bucal, saliva fresca, saliva seca en papel filtro (Wathman), cabellos con bulbo, sangre seca en papel filtro (Wathman) y sangre líquida de personas voluntarias.

4.2.1. Hisopado bucal

Con un hisopo estéril de algodón se frotaron las encías y mejillas internas constantemente sin ocasionar sangrado, se dejó secar a temperatura ambiente 1 hora aproximadamente, se colocó en un tubo eppendorf el hisopo que contenía la muestra, se rompió el vástago dentro el tubo y se procedió al aislamiento respectivo.

4.2.2. Saliva

Se recolectó 2 muestras de saliva, saliva en fresco y saliva en papel.

4.2.2.1. Obtención de saliva en fresco

Se recolectó la muestra en un tubo de vidrio estéril con ayuda de un bulbo de plástico (colector), aproximadamente 2 ml de saliva fresca y se tapó, para evitar cualquier tipo de contaminación.

4.2.2.2. Obtención de saliva en papel

Con el bulbo de plástico se dejó caer unas 3 gotas de saliva sobre el papel filtro, se hizo secar a temperatura ambiente por el lapso de 1 a 2 horas aproximadamente. Se cortó el papel con una perforadora alrededor de la muestra aproximadamente unos 5 mm de diámetro, se colocó en tubos eppendorf estériles y luego se procedió al aislamiento de ADN humano.



4.2.3. Cabellos

Se seleccionó un solo cabello con bulbo y se colocó en un tubo eppendorf estéril, con el bulbo hacia abajo.

4.2.4. Sangre

Se recolectó muestras de sangre líquida y muestras de sangre en papel filtro Wathman de la siguiente manera:

4.2.4.1. Obtención de Sangre Líquida:

Se realizó la asepsia en la zona de venopunción con una torunda embebida en alcohol yodado, se aplicó una ligadura, se introdujo la aguja de la jeringa hipodérmica y se tomó 5 ml de sangre venosa. Colocamos lentamente en un tubo estéril que contenga 200 ul de EDTA al 7%. Se homogenizó lentamente.

4.2.4.2. Obtención de Sangre seca en Papel:

Se eligió un sitio adecuado para la punción, se calentó masajeando el pulpejo del dedo, se efectuó la asepsia con una torunda embebida en alcohol yodado y con ayuda de una lanceta estéril se procedió a la punción desechando la primera gota en un algodón seco y se hizo caer unas 3 gotas en el mismo lugar sobre el papel filtro Wathmann estéril, se dejó secar la muestra a temperatura ambiente una hora aproximadamente, verificando que la muestra quede totalmente seco. Finalmente se guardó en un sobre nuevo, previamente identificado hasta el momento del aislamiento.



4.3. Aislamiento de ADN

4.3.1. Aislamiento de ADN con Kit comercial

El aislamiento de ADN se realizó mediante dos kits otorgados gentilmente por los representantes en Bolivia de SIGMA ALDRICH.

Kit para aislamiento de tejidos (REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit)

Una vez obtenida las muestras de los diferentes tejidos biológicos se incubaron 10 ul de éstas en 125 ul de Solución de Extracto y Solución de Preparación de Tejido a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para la desnaturalización del ADN las muestras se incubaron a 95 °C durante 3 minutos. Luego se agregó la Solución de Neutralización B, y se mezcló en vortex. Este aislado ya esta listo para su amplificación.

Kit para el aislamiento de sangre (REDExtract-N-Amp Blood PCR Kit)

Para aislar el ADN humano con este kit se utilizó sangre líquida y sangre seca en papel filtro y se procedió al aislamiento de la siguiente manera:

Aislamiento de sangre líquida

Se incubaron 10 ul de la muestra de sangre líquida en Solución de Lisis a temperatura ambiente durante 5 minutos, se mezcló con ayuda de un vortex. Se añadió la Solución de Neutralización.

Aislamiento de sangre seca en papel

Con ayuda de una perforadora estéril cortamos aproximadamente 5 mm de diámetro alrededor de la muestra de sangre ya seca y sumergimos en tubos eppendorf de 1,5 ml con Solución de Lisis a 55 °C por el lapso de 15 minutos. Posteriormente se añadió la Solución de Neutralización. En caso de no proceder a la amplificación inmediata de estas muestras por los kits utilizados, éstos deberán conservarse a una temperatura de -20 °C.



4.3.2. Aislamiento de ADN por método convencional

Para el aislamiento de ácidos nucleicos se utilizó el método enzimático orgánico, la cual se incubó sobre la muestra obtenida Solución de lisis (compuesta por NH₄Cl 155mM, NaHCO₃ 10 mM EDTA 0,1 mM, pH 7,4) durante 15 minutos, se centrifugó a 3000 rpm por el lapso de 10 minutos, se resuspendió la pastilla de leucocitos en 6 ml de TE 1X (Tris-HCl 10 mM. EDTA 1 mM pH 8) y se añadió 180 ul de Proteinasa K, la cual es una enzima proteolítica q habitualmente se usa, porque es necesaria la lisis de las proteínas para el aislamiento de ADN humano, al mismo tiempo se añadió 300 uL de SDS al 20%, éste es un detergente iónico. En este punto pueden interferir ciertas sustancias que inhiben esta lisis y no permiten el acceso a la molécula genética. Otro problema de este paso es que el SDS es un fuerte inhibidor de la enzima Taq polimerasa que se utiliza durante la PCR, por lo que será necesario realizar un paso de purificación para retirarlo. Se incubó durante 2 horas aproximadamente a 50 °C con este paso también lograremos que se inactiven fácilmente por calor para evitar que interfieran en la reacción de amplificación, se sacaron los tubos y se añadió 1 ml de NaCl 5M, se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se trasvasó a un tubo con etanol absoluto frío 2 ½ volumen del sobrenadante, se mezcló suavemente y con ayuda de una pipeta pasteur con la punta doblada se tomó la malla de ADN ya formada en el tubo, se sumergió en 500 ul de TE 1X y se vortexeó varias veces.

Estas muestras se conservaron a -20 °C, hasta su amplificación.

4.4. Cualificación de ADN

Para la cuantificación de ADN se utilizó geles de agarosa al 2% en TBE 1X, se depositaron 10 ul de ADN aislado mezclado con 2 ul de Azul de bromo fenol en cada pocito del gel. Luego se sometieron las muestras de ADN aislado aun campo eléctrico de 150 V y 350 mA durante 40 minutos aproximadamente, para que las moléculas migren y puedan hacerse



visibles con la ayuda del colorante bromuro de etidio 10 mg/ml. Se estimó la cantidad de ADN en forma subjetiva, observando la intensidad de la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta que se produce cuando se intercalan moléculas de Bromuro de Etidio entre el ADN.

4.5. EVALUACIÓN DEL ADN AISLADO

Se ha evaluado la calidad del ADN humano a través de la amplificación por el método PCR – STR's, utilizando los cebadores de la línea PROMEGA CTT (CSF1PO, TPOX, THO1), FFv (F13A01, FESFPS, FFv), y SILVER (D16S539, D7S820, D13S317) respectivamente.

4.5.1. Amplificación de ADN por PCR - STR's

Preparación de mezcla de reactivos para PCR

Amplificación de ambos kits

Los kits que se usaron contienen la mezcla de todos los reactivos para PCR requeridos, excepto los cebadores y el agua PCR. Los volúmenes utilizados para los kits fue la siguiente:

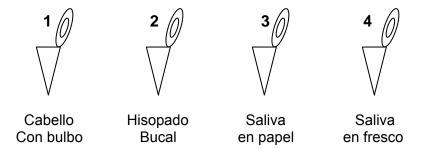
MEZCLA DE REACTIVOS PCR PARA EL KIT DE TEJIDOS PARA EL SISTEMA SILVER

MEZCLA DE REACTIVOS PCR	VOLUMEN
REDExtract-N-Amp Tissue PCR	20 uL
Agua PCR	16 uL
Cebador ó "primer" (SILVER)	4 uL
TOTAL	40 uL (*)
Muestra de ADN aislado	2 uL

^(*) Una vez preparada la mezcla para PCR se distribuyó a todos los tubos 10 uL, se realizó este procedimiento en hielo. Luego se agregó 2 uL de cada ADN aislado a los tubos con la mezcla.



Número de tubos utilizados: 4 Muestras para 1 sistema (SILVER)



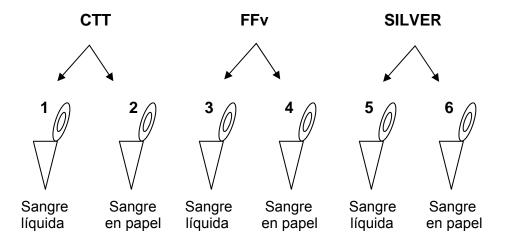
MEZCLA DE REACTIVOS PCR PARA KIT DE SANGRE

MEZCLA DE REACTIVOS PCR	VOLUMEN
REDExtract-N-Amp Blood PCR	30 uL
Agua PCR	24 uL
Cebador (CTT, FFv y SILVER)	6 uL
TOTAL	60 uL (*)
Muestra de ADN aislado	2 uL

(*) Una vez preparada la mezcla para PCR se distribuyó a todos los tubos 10 uL, realizando este procedimiento en hielo. Luego se añadió 2 uL de ADN aislado a los tubos con la mezcla de la siguiente manera:

Número de tubos utilizados: 6

Muestras para los 3 sistemas



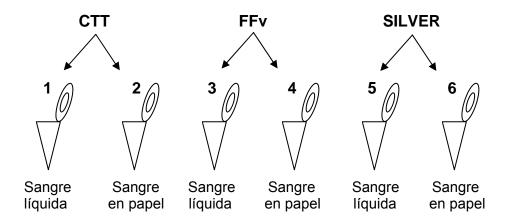


MEZCLA DE REACTIVOS PCR PARA EL MÉTODO CONVENCIONAL

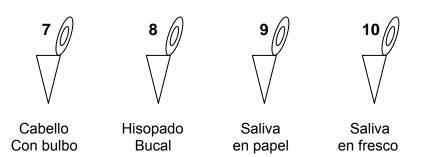
MEZCLA DE REACTIVOS PCR	VOLUMEN
Agua PCR	50 uL
Cebador (CTT, FFv y SILVER)	40 uL
Taq polimerasa	10 uL
TOTAL	100 uL (*)
Muestra de ADN aislado	2 uL

^(*) Una vez preparada la mezcla para PCR se distribuyó a todos los tubos 10 uL, realizando este procedimiento en hielo. Luego se añadió 2 uL de ADN aislado a los tubos con la mezcla de la siguiente manera:

Muestras de sangre para los 3 sistemas



SISTEMA SILVER





La amplificación se realizó en el termociclador Perkin Elmer 9600 dirigido por un programa de 30 ciclos a diferentes temperaturas:

PASO	TEMPERATURA °C	TIEMPO		
1	96	2 min.		
2	94	1 min.		
3	60	1 min.		
4	70	1 min., 30 seg.		
5	Ir al paso 2 - 10 veces			
6	90	1 min.		
7	60	1 min.		
8	70	1 min., 30 seg.		
9	Ir al paso 6 - 20 veces			
10	60	30 min.		
11	4	infinito		

Esta amplificación se basa en 3 fases: 1º fase de desnaturalización a 94-96 °C en la que se produce la separación, 2º fase de apareamiento o hibridación de 60 °C en la que se colocan los cebadores en las zonas complementarias de la hebra molde y la 3º fase de elongación o extensión a 70 °C: con los cebadores apareados. Luego evaluamos la presencia de amplicones en gel de agarosa

Verificación de los amplicones en gel de agarosa

Se verificó la presencia o ausencia de los amplicones ya obtenidos en la anterior etapa, utilizando el gel de agarosa con una longitud promedio de 8 cm, éste estaba al 2 % con la solución de Bromuro de etidio en una concentración de 10 mg/ml, se realizó la corrida electroforética a 150 V y 350 mA por el tiempo de 40 minutos aproximadamente. Con ayuda de un transiluminador se logró ver la fluorescencia emitida con bromuro de etidio, gracias a los rayos ultravioleta.



4.5.2. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

4.5.2.1. Preparación de los geles

4.5.2.1.1. Armado de los vidrios

Se utilizan 2 vidrios uno largo y otro corto, se lavan los 2 vidrios con detergente y abundante agua, previo remojo con Hidróxido de Sodio toda la noche.

Vidrio largo: limpiar con Solución de Unión, dejar evaporar y se eliminó el exceso con Etanol al 95 %.

Vidrio corto: pasar con la solución repelente en todo el vidrio, luego de que se evapore se pasó con agua destilada, para retirar el exceso.

4.5.2.2. Preparación del gel

Se diluyó la urea, agregando 6 ml de tampón TBE 10X, se añadió 15 acrilamida/bisacrilamida, ml finalmente se agregó los catalizadores (Temed y Persulfato de amonio al 10%), se mezcló suavemente para evitar la formación de burbujas, se vació rápidamente el gel sobre uno de los vidrios, éstos vidrios deben tener los espaciadores del mismo espesor del peine (0,4 mm), con mucho cuidado se colocó el otro vidrio sobre la superficie del gel, evitando la formación de burbujas y que por contacto el gel se distribuya por todo el espacio formado entre los vidrios, se introdujo el peine y se aseguró las dos láminas colocando los ganchos a ambos extremos laterales, se dejó gelificar por el lapso de unas 2 a 3 horas aproximadamente. Luego se colocó a la cámara electroforética vertical.



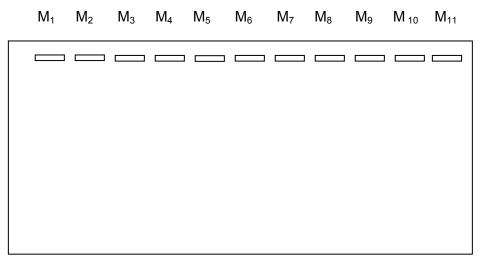
Preparación de la cámara electroforética

Se colocó los vidrios a la cámara electroforética con el vidrio más largo hacia delante, se aseguró con las pinzas, se agregó tampón TBE 0,5X en la parte superior e inferior de la cámara y se retiró el peine del gel, luego con ayuda de una jeringa se lavó el gel para retirar restos de urea cristalizada en los pozos y finalmente se calentó hasta llegar a una temperatura de 40 °C.

4.5.2.3. Sembrado de Amplicones en el gel de poliacrilamida

Se colocó 2,5 ul de colorante Azul de Bromofenol y 2,5 ul de los amplicones en tubos de 200 uL se mezcló suavemente, previo a sembrar se puso al termociclador durante 5 minutos a 95°C para que el ADN se denature, luego se sumergió inmediatamente en hielo, esto para que el ADN no se una y se procedió a cargar 5 ul de las muestras en los pozos, este procedimiento se realizó en forma rápida y con pausas de tiempo cada 5 muestras, esto para evitar que el gel se enfríe.

Sembrado de muestras en gel de poliacrilamida



 M_1 : Cabello con bulbo, M_2 : Hisopado bucal, M_3 : Escalera (SILVER), M_4 : Saliva en papel, M_5 : Saliva en fresco, M_6 : Escalera (CTT), M_7 : Sangre en papel, M_8 : Sangre líquida, M_9 : Escalera (FFv), M_{10} : Sangre líquida (MC*), M_{11} : Sangre en papel (MC*). (MC*): Método convencional



Se dejó correr a 2000 V alrededor de unas 3 a 4 horas, hasta que el colorante migre aproximadamente 34 cms como se ve en la figura.



Luego de la electroforesis se prosiguió a retirar el gel de la cámara, se retiraron los espaciadores, separaron ambas láminas teniendo el cuidado de no dañar el gel. Se colocó la lámina con gel en un recipiente de plástico y se procedió al revelado.

4.5.2.4. Revelado del gel

El revelado consiste en lavar con 3 soluciones diferentes.

Solución fijadora (Acido acético 0,5%/Etanol 95%): Se sumergió la lámina en solución fijadora en forma horizontal y se agitó por el lapso de 40 minutos, sin parar.

Solución de nitrato de plata: Se empapó en nitrato de plata y de la misma manera se agitó la placa por el lapso de 40 minutos, aproximadamente.

Solución Reveladora (Hidróxido de Sodio 3%/formaldehido): Se remojó en Hidróxido de Sodio con Formaldehído y proceder igual que en los pasos anteriores agitando hasta que las bandas comiencen a ser visibles.



5. RESULTADOS

5.1. Electroforesis de ADN aislado en gel de Agarosa

Luego de la corrida electroforética y con ayuda del transiluminador se pudo verificar la presencia de ADN humano, de las muestras aisladas sobre el gel de agarosa.

Los métodos de aislamiento evaluados para los diferentes tejidos biológicos fueron el método convencional y kits comerciales.

MÉTODO CONVENCIONAL

En el método convencional se observó una fluorescencia leve, esto se debió a que no se aisló mucha cantidad de ADN humano. (Figura 1)

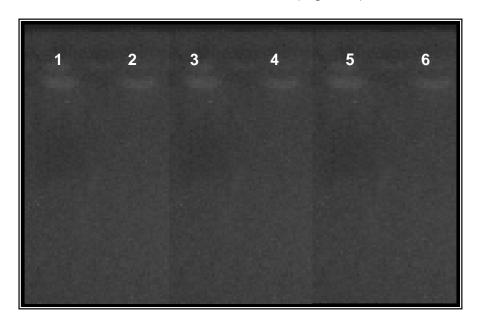


Figura 1: 1 muestra de sangre líquida, 2 muestra de sangre seca en papel, 3 Cabello con bulbo, 4 Saliva en fresco, 5 Saliva en papel, 6 Hisopado bucal aislado por el método convencional



MÉTODO POR KITS COMERCIALES

En el método por kits comerciales la presencia de ADN humano sobre el gel de agarosa, tuvo mejores resultados.

Las muestras de sangre líquida y sangre en papel se aislaron por kit comercial para sangre, las muestras de cabello con bulbo, saliva en fresco, saliva en papel e hisopado bucal se aisló por kit comercial para tejidos.

La cantidad de ADN humano aislado fue diferente para cada tejido. (Figura 2)

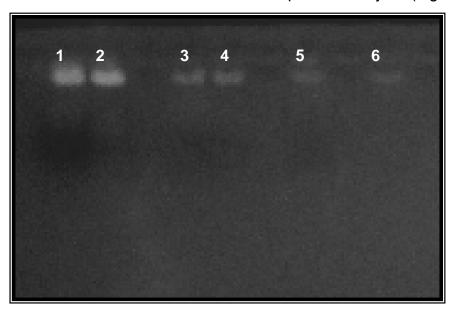


Figura 2: 1 Sangre total, 2 Sangre en papel, (Kit para sangre)
3 Cabello con bulbo, 4 Saliva en fresco, 5 Saliva en papel,
6 Hisopado bucal (kit para tejidos)

- Una fluorescencia intensa en las bandas de ADN procedentes de las muestras de sangre líquida y sangre en papel
- Fluorescencia intermedia en bandas de ADN proveniente de la muestra de cabello.
- Leve fluorescencia en bandas de ADN de muestras originadas en saliva en fresco, saliva en papel e hisopado bucal.



5.2. AMPLIFICACIÓN EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se consiguió amplificar con gran éxito los 3 sistemas utilizados sobre el gel de poliacrilamida, como patrón para identificar los ADN humano aislados de diferente manera de los tejidos biológicos. (Figura 2)

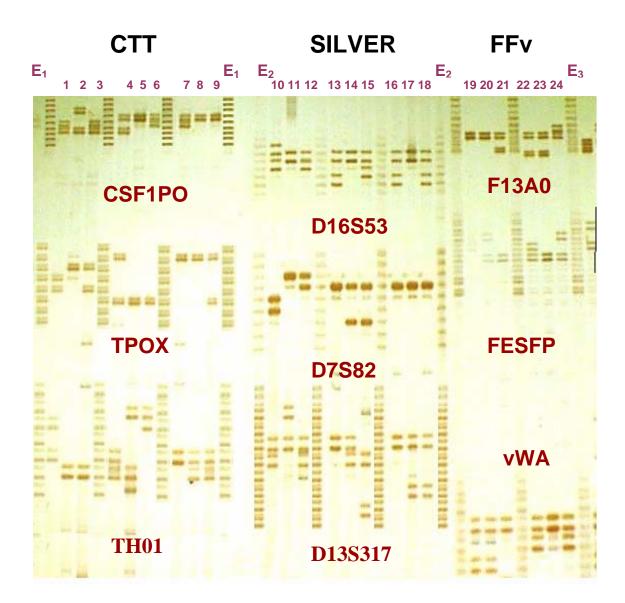
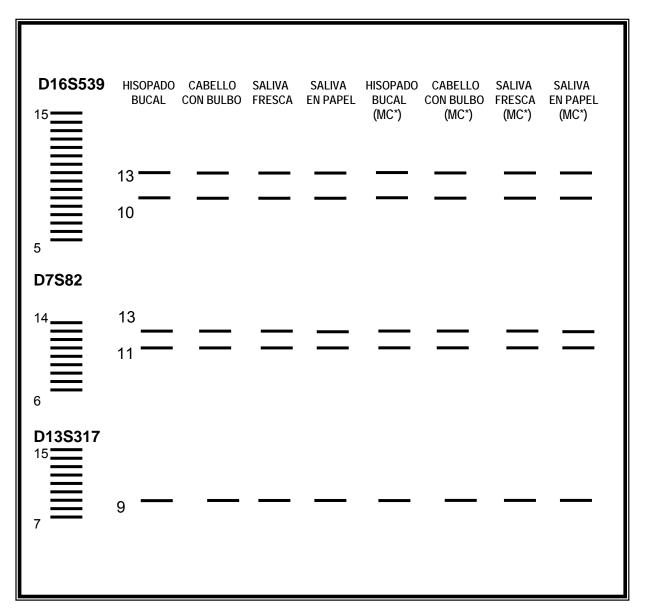


Figura 2: Amplificación de los sistemas CTT, SILVER, y FFv con los 9 loci respectivamente.



5.2.1. KITS COMERCIALES

5.2.1.1. KIT PARA TEJIDOS Y MÉTODO CONVENCIONAL SISTEMA SILVER



^{*} Método convencional

Entre las muestras amplificadas por éste método PCR – STR's, se logró evaluar de manera cualitativa la calidad de ADN aislado a partir de diferentes muestras de tejidos biológicos, determinando los perfiles genéticos.



5.2.1.2. PERFILES GENÉTICOS ENCONTRADOS:

SISTEMA SILVER

	Hisopado	Cabello	Saliva	Saliva en	Hisopado	Cabello	Saliva	Saliva en
	bucal	con bulbo	fresca	papel	bucal	con bulbo	fresca	papel
D16S539	13/10	13/10	13/10	13/10	13/10	13/10	13/10	13/10
D7S820	13/11	13/11	13/11	13/11	13/11	13/11	13/11	13/11
D13S317	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9

13/10, 13/11, 9/9: éstos corresponden a los alelos para cada marcador, asignados según el patrón de bandas comparando éste con su respectiva escalera alélica.

Se observó que en todas las muestras se encontraron los mismos alelos para el Sistema SILVER con sus 3 loci respectivamente, esto debido a que las muestras de los diferentes tejidos biológicos corresponden a una misma persona.



5.2.1.3. KIT PARA SANGRE Y MÉTODO CONVENCIONAL

SISTEMA FFv

F13A01	SANGRE LÍQUIDA (KIT)	SANGRE EN PAPEL (KIT)	SANGRE LÍQUIDA (M.C.*)	SANGRE EN PAPEL (M.C.*)
4	6			
4 =	6 —	<u> </u>	<u> </u>	=
FES5FP				
	11			_
7 =				
20				
	17			
13	16			

^{*} Método convencional

Las muestras utilizadas para este sistema presentaron diferentes perfiles genéticos en relación a las muestras de los tejidos biológicos, para este sistema con sus 3 loci respectivos.

-	Sangre líquida	Sangre en papel	Sangre Líquida (MC)	Sangre en papel (MC)
F13A01	6/4	6/4	6/4	6/4
FES5FP	11/11	11/11	11/11	11/11
vWA	16/17	16/17	16/17	16/17



SISTEMA CTT

CSF1PO	SANGRE LÍQUIDA (KIT)	SANGRE EN PAPEL (KIT)	SANGRE LÍQUIDA (MC*)	SANGRE EN PAPEL (MC*)
16 *** 4 ***	8	_	_	
TPOX 14 ===================================	13 —			
7 T H01	9 ——	_	_	
13	18 ——	_	_	_

^{*} Método convencional

	Sangre líquida	Sangre en papel	Sangre líquida (MC)	Sangre en papel (MC)
CSF1P0	6/8	6/8	6/8	6/8
TPOX	9/13	9/13	9/13	9/13
TH01	18/18	18/18	18/18	18/18



SISTEMA SILVER

D16S539	SANGRE LÍQUIDA (KIT)	SANGRE EN PAPEL (KIT)	SANGRE LÍQUIDA (MC*)	SANGRE EN PAPEL (MC*)
5	12 <u> </u>	=	=	
D7S82				
14	13 11	=	=	
D13S317 15	9 —			

^{*} Método convencional

	Sangre líquida	Sangre en papel	Sangre líquida (MC)	Sangre en papel (MC)
D16S539	10/12	10/12	10/12	10/12
D7S820	11/13	11/13	11/13	11/13
D13S317	9/9	9/9	9/9	9/9



6. DISCUSIONES

El aislamiento de ADN humano por PCR – STR's es el método más preciso que existe debido a que el ADN de cada persona es único. El material genético de un individuo es posible obtener de casi cualquier muestra de tejido biológico como sangre, saliva, cabellos con bulbo, etc. esto es posible por que todas las células diploides de un individuo tienen el mismo material genético.

En el trabajo realizado evaluamos los métodos de aislamiento de ADN humano a partir de diferentes tejidos biológicos por medio de métodos de kits comerciales y método convencional.

Por otro lado el método convencional es un poco más complejo, de una duración larga, corriendo el riesgo de perder la muestra de tejido biológico durante su procesamiento.

La amplificación que se realizó por el método de PCR - STR's, ofrecen la ventaja de poder tipificarse en mínimas cantidades de muestra, posibilitando aislar material útil desde diferentes tejidos biológicos tan pequeños como una gota de sangre o saliva, raíz de pelo, etc, recomendables a estos exámenes a niños recién nacidos o a personas en las cuales la punción venosa resulta complicada.

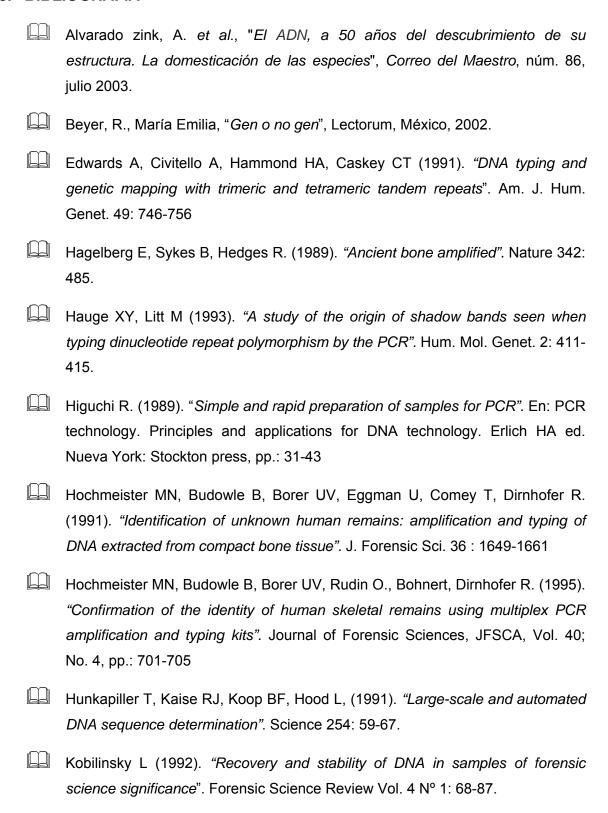


7. CONCLUSIONES

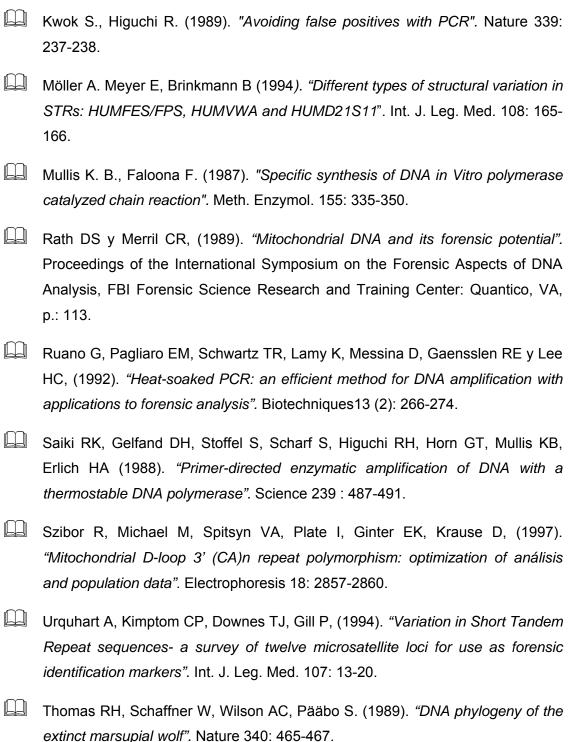
- Realizada la evaluación del método convencional y kits comerciales en ADN humano a partir de diferentes tejidos biológicos, se observó que las muestras de sangre líquida y sangre seca en papel dan mejores resultados que las muestras de saliva fresca, saliva seca en papel, cabello con bulbo e hisopado bucal por medio de kits comerciales, en relación al método convencional.
- Evaluado el aislamiento y amplificación de ADN humano a partir de muestras provenientes de tejidos biológicos por medio de kits comerciales, concluimos que éstos son mejores utilizando mínimas cantidades de muestra y sin riesgo de perderlas durante su procesamiento, es sencillo y de corta duración.
- Realizado la comparación de los métodos de aislamiento de ADN humano convencional y de kits comerciales, se determinó que el método por kit comercial permite obtener resultados óptimos, porque se obtuvo mayores cantidades de ADN en relación al método convencional.
- ➤ La determinación de perfiles genéticos por el PCR STR's, permitió observar mayor eficiencia en la calidad de ADN cuando este fue aislado por los Kits comerciales.



8. BIBLIOGRAFÍA













ANEXO 1

MATERIAL UTILIZADO PARA EL AISLAMIENTO DE ADN HUMANO

Fotografía 1



Material totalmente estéril

Fotografía 2



Kit comercial para el aislamiento de ADN



Fotografía 3



Vórtex



Microcentrifugadora



Fotografía 5



Heating Blood



Centrifugadora



ANEXO 2

EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN HUMANO

Fotografía 7



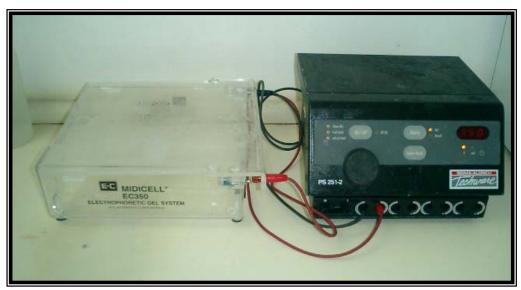
Campana de luz ultravioleta



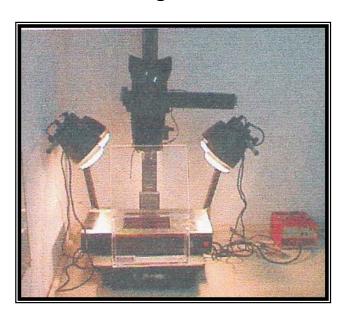
Termociclador PERKIN ELMER 9600



Fotografía 9

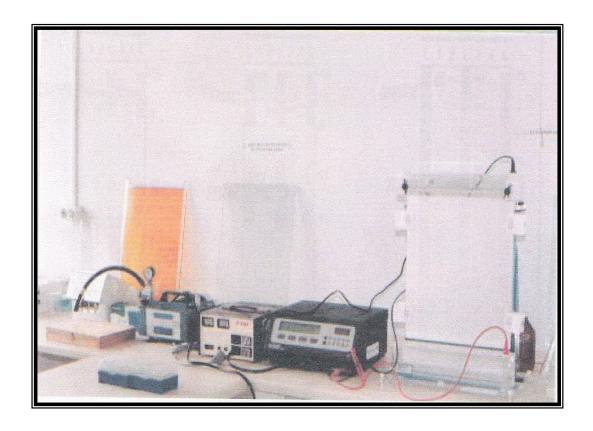


Electroforesis



Transiluminador





Equipo para la obtención de "perfiles genéticos"