

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



**TRABAJO DIRIGIDO PARA OPTAR AL TITULO DE
LICENCIATURA EN BIOQUIMICA**

TITULO:

**“COMPARACION DE LA EFICACIA DE AISLAMIENTO DE
ADN HUMANO A PARTIR DE MANCHAS DE SANGRE
RECOLECTADAS EN PAPEL FILTRO WHATMAN N°3, PAPEL
NUCLEICO Y PAPEL FTA”**

POSTULANTE:

IVANOSKA KATTERINE ZURITA MONTAÑO

TUTORA:

Dra. SUSANA REVOLLO *PhD.*

**LA PAZ – BOLIVIA
2006**

DEDICATORIA

*Mi trabajo lo dedico a Dios por todas las bendiciones que me
ha dado en el transcurso de mi vida
A mi bebe que es el pilar de mi vida
Al apoyo incondicional de mi Mamá y Papá
A mi hermana y a mi esposo*

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la Dra. Susana Revollo por el asesoramiento en la ejecución de mi Trabajo Dirigido.

Asimismo al Instituto SELADIS, en especial a todo el equipo que integra la unidad de Biología Molecular. Gracias por toda su ayuda y apoyo.

A los amigos y compañeros que conocí en el transcurso de mi formación profesional, quienes supieron valorar la amistad sincera que perdurara por siempre.

RESUMEN.

La biología molecular con el paso del tiempo fue evolucionando de una manera muy sorprendente debido a los estudios que se realizaron a lo largo de los años sobre la molécula de ADN, convirtiéndose dicha molécula en el fundamento para la investigación en diferentes ámbitos.

Los estudios realizados sobre la molécula de ADN fueron evolucionando de una forma sorprendente convirtiéndose esta molécula en la base fundamental de la vida.

En la actualidad la molécula de ADN es utilizada para el diagnóstico de varias enfermedades y también es utilizada para la identificación humana a través de las secuencias polimórficas ubicadas en los sectores no codificantes de la molécula de ADN.

Con la finalidad de realizar estudios forenses y de paternidad se han creado numerosos soportes para la recolección de todo tipo de muestras, entre estos soportes están los soportes de papel como el papel filtro Whatman, Papel FTA y Papel Nucleico que serán comparados en el presente trabajo.

Estos soportes tienen la finalidad de mantener la estabilidad de la molécula de ADN, tanto en el momento de la recolección como transporte y extracción del ADN propiamente dicho, teniendo en cuenta que la cantidad de muestra recolectada por lo general es mínima, principalmente en los casos de investigación forense.

En el presente trabajo se estudiaron tres tipos de soportes de papel para la recolección de muestras de sangre y comparando el material genético obtenido mediante la identificación de ADN humano por amplificación en PCR utilizando marcadores del Cromosoma Y (DYS 390 y DYS 392). Verificando la presencia de ADN a través de la electroforesis en gel de agarosa y verificando la presencia de ADN humano amplificado a través de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

También se verificó la presencia de ADN obtenido según el procedimiento de extracción y tiempo de conservación con cada uno de los tres soportes y se llegó a la conclusión de que se obtiene ADN en los tres casos. La diferencia radicaría en cuanto al tiempo entre la toma de muestra y extracción del material genético y el tiempo de conservación del ADN una vez extraído. También en cuanto al procedimiento de extracción se ha determinado que son más eficientes los procedimientos del papel Nucleico y el papel FTA.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 TRABAJOS REALIZADOS ANTERIORMENTE	2
2.2 SOPORTES DE PAPEL PARA LA COLECTA DE MUESTRAS	9
2.2.1 Papel FTA	9
2.2.1.1 Tipos de Tarjeta FTA	12
2.2.2 Papel Nucleico	15
2.3 OTROS SOPORTES	16
3. MARCOTEORICO REFERENCIAL	17
3.1 MOLECULA DE ADN	17
3.2 ESTRUCTURA DEL ADN	18
3.3 ADN DESDE EL PUNTO DE VISTA ANALITICO	19
3.4 ADN DESDE EL PUNTO DE VISTA BIOLOGICO Y FUNCIONAL	20
3.5 REGIONES MICROSATELITES DEL GENOMA HUMANO	27
3.5.1 Cromosoma Y	28
3.5.1.1 Estructura y Características del Cromosoma Y en el Rastreo de Líneas Paternas	28
3.5.1.2 Las Regiones Polimorfitas Presentes en el Cromosoma Y	30
3.6 ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS	33
2.6.1 Fundamento	33
2.6.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	35
2.6.3 Electroforesis en Gel de Agarosa	37
3.7 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	40
3.7.1 Contaminación de la PCR	46
4. JUSTIFICACION	48
5.OBJETIVOS	49
5.1 OBJETIVOS GENERALES	49
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	49
6. MATERIAL Y METODOS	50
6.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA	50
6.2 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA EN PAPEL FILTRO WHATMAN N°3	50
6.3 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA EN PAPEL FTA	53
6.4 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA EN PAPEL NUCLEICO	55
6.5 AMPLIFICACION POR PCR	56
6.6 ELECTROFORESIS	58
6.6.1 Electroforesis en gel de Agarosa	58
6.6.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	60
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	63
7.1 Resultado de la extracción de ADN	63
7.2 Resultado de la Electroforesis en Gel de Agarosa	64

7.3 Resultado de la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	67
8. CONCLUSIONES	70
9. BIBLIOGRAFIA	73
ANEXOS	74

1. INTRODUCCION

El ADN es el material genético de los seres vivos que determina sus características. La estructura de esta molécula fue propuesta por Watson y Crick en 1953, a partir de esta fecha se ha dado un desarrollo extraordinario en el conocimiento del material genético.¹

En la actualidad se conoce que el ADN humano posee regiones codificantes y regiones no codificantes.

El ADN expresivo o codificante, además 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 a 95%, se ha denominado “Basura”, por que no es transcrito 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.²¹

Aunque los organismos de una misma especie tienen características comunes, cada individuo posee cualidades únicas.

Actualmente se conoce que existen muchas regiones de los cromosomas humanos, que presentan una gran variabilidad, tales secuencias variables del ADN son llamadas

¹¹ Luque, Jose. BILOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

polimórficas y son la base para la identificación forense y relaciones de parentesco como análisis de paternidad.

Debido a la gran importancia que tiene el material genético de un tiempo a esta parte, y sobre todo para investigaciones de tipo forense es necesario contar con soportes para la recolección de muestras, puesto que por lo general las muestras son mínimas y estas deben estar bien conservadas, libres de contaminación y fáciles de manipular y transportar.

En el presente trabajo se realizó un estudio comparativo de tres soportes de papel, con tal motivo se recolectaron manchas de sangre de individuos para luego aislar el ADN y tipificar el mismo con marcadores del Cromosoma Y.

2. ANTECEDENTES

2.1 TRABAJOS REALIZADOS ANTERIORMENTE

Los siguientes son los resúmenes de los trabajos que fueron realizados utilizando algunos de los soportes que se estudian en el presente trabajo.

Diagnóstico serológico del VIH-1 en muestras de sangre seca en papel de filtro por el sistema DAVIH Dot VIH-1.

[Lic. René Grana Sánchez,¹ Lic. María Teresa Pérez Guevara,¹ Dra. Ana Luisa Lubián Caballero,² Dr. Héctor Díaz Torres³ y Téc. Lucy Montano Tamayo⁴](http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol50_3_98/mtr11398.htm)http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol50_3_98/mtr11398.htm - autores

Resumen

Se evaluaron muestras de sangre seca en papel de filtro por el sistema DAVIH Dot VIH-1 de Laboratorios DAVIH (La Habana, Cuba). Las muestras utilizadas, 103 positivas y 105 negativas, estaban confirmadas de forma previa por DAVIH Blot de Laboratorios DAVIH. Para utilizar la sangre seca en papel de filtro, se realizaron modificaciones al procedimiento

original en cuanto a los tiempos de incubación de las muestras y conjugado, y la agitación en ambas etapas. Se obtuvieron resultados de sensibilidad y especificidad relativas de 100 y 99,05 %, respectivamente. Descriptores DeCS: SERODIAGNOSTICO DEL SIDA/métodos.

El diagnóstico de la infección por VIH-1 lleva implícito la realización de varios sistemas de pesquisaje en la red de diagnóstico nacional, así como la confirmación en el caso de las muestras que resulten reactivas, para lo cual se hace necesario el envío de éstas a un laboratorio de referencia. En ocasiones se dificulta el traslado de dichas muestras, sobre todo si no se garantizan una temperatura adecuada y la seguridad biológica.¹ En el caso de lugares aislados o laboratorios rurales donde en ocasiones no se cuenta con fluido eléctrico para mantener las muestras a la temperatura establecida, es factible el empleo de la sangre seca en papel de filtro, que no está condicionada a estos parámetros.²

El empleo de sangre seca en papel de filtro se ha extendido rápidamente en el diagnóstico serológico de varias enfermedades³⁻⁵ dadas las facilidades que posee en cuanto a traslado, conservación y manipulación de las muestras.⁶ Este método tiene más aceptación que las extracciones convencionales de sangre.

La colecta de sangre total en papel de filtro para los ensayos de anticuerpos, tiene sólo ventajas sobre el uso de muestras de suero: los requerimientos de equipos son mínimos, las lancetas estériles son baratas y el papel de filtro sustituye a las jeringas, tubos, centrífugas y refrigeradores que se necesitan para las muestras de suero.⁷

La posibilidad de contar con ensayos rápidos y simples como el DAVIH Dot VIH-1 (Laboratorios DAVIH, La Habana, Cuba), es una ventaja en estos sitios apartados,⁸ por lo que resulta práctico modificar el procedimiento de esta técnica con el objetivo de introducir esta forma de procesamiento de las muestras.

Nuestro trabajo describe la evaluación del DAVIH Dot VIH-1 con la utilización de muestras de sangre seca en papel de filtro.

Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular .

Tesista Gustavo Adolfo Penacino.

Director: Dr. Daniel Corach.

Resumen

A mediados de los '80 comienzan a desarrollarse sistemas de identificación de individuos basados en el estudio de polimorfismos de ADN, los cuales reflejan la amplia variación de secuencias localizadas en diferentes regiones del genoma.

La variabilidad de estas zonas radica en diferencias exhibidas por el material genético, en la secuencia nucleotídica misma a través de sustituciones de nucleótidos, o en la distinta longitud generada por una misma secuencia que se repite un número diferente de veces, como fuera demostrado por primera vez por Wyman and White (1980). Comenzaron a ser estudiadas cuando fue posible conocer su localización y desarrollar una metodología adecuada para ponerlas de manifiesto, mediante sistemas de análisis cada vez más precisos y sencillos.

Los primeros trabajos, publicados a mediados de los '80, empleaban fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas, separados electroforéticamente y transferidos a un soporte sólido, el cual se trataba con una "sonda" constituida por secuencias complementarias de las regiones variables, marcada radiactivamente. Por autorradiografía, resultaba posible observar varias bandas, de localización desconocida dentro del genoma, pero que eran características de cada individuo y se heredaban de padres a hijos (Jeffreys et al, 1985a y b).

Si bien las bandas producidas por estas sondas multilocus eran muy variables de una persona a otra, los resultados eran difícilmente reproducibles, ya que pequeñas y poco controlables diferencias en la corrida electroforética (voltaje, tiempo, concentración del gel) afectaban en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados.

El descubrimiento de regiones hipervariables del genoma con localización específica (Nakamura et al, 1987) permitió el desarrollo de las sondas de locus único que resolverían el problema, posibilitando el estudio de una zona conocida del genoma que se visualizaba como dos únicas bandas para la condición heterocigota, correspondientes cada una a un alelo, heredado de cada progenitor.

Estas zonas están constituidas por secuencias repetidas, que aparentemente carecen de función como codificantes de proteínas. La menor variabilidad exhibida por estos sistemas

de análisis se solucionaba empleando un conjunto de cuatro o más sondas unilocus que evaluaban otras tantas regiones del genoma.

Sin embargo, aún persistía un inconveniente para el empleo masivo de estas metodologías en la práctica forense: las sondas multilocus, y en menor medida las unilocus, requerían un ADN en estado óptimo en cuanto a su integridad, de alto peso molecular, lo cual rara vez ocurre en cadáveres en proceso de descomposición, o en manchas antiguas de fluidos biológicos o expuestas a condiciones ambientales adversas.

La solución llegó con el desarrollo de técnicas de amplificación o "copiado" de porciones de ADN mediante la "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", con las cuales fue posible implementar sistemas de análisis de secuencias más pequeñas ("microsatélites" o "STRs"), pero menos variables que las anteriores. Con el advenimiento de esta nueva técnica, se hizo posible la evaluación de polimorfismos en cuanto a la secuencia nucleotídica de la región variable, además de las diferencias de longitud.

La permanente innovación metodológica exige la actualización y perfeccionamiento de los sistemas validados por la comunidad forense internacional, que cuenta al presente con la posibilidad de evaluar un centenar de regiones variables del genoma.

En una primera etapa, el presente trabajo consistió en el perfeccionamiento de las técnicas de extracción y purificación de ADN a partir de fluidos biológicos y sus manchas obtenidas experimentalmente, estudiándose la influencia del soporte y de la presencia de mezclas.

Posteriormente, se analizaron manchas e hisopados provenientes de casos judiciales que contenían semen y fluidos no seminales, evaluándose la eficiencia de los métodos de purificación, de las condiciones de conservación y del soporte, correlacionando los resultados con los obtenidos previamente.

En una segunda etapa, se estudiaron pelos, uñas y material cadavérico en condiciones de conservación variable, proveniente de individuos de diferente edad y sexo, a efectos de determinar los métodos de extracción de ADN más eficientes y las condiciones de conservación más adecuadas de las muestras.

El estudio de tejidos humanos provenientes de desastres en masa (atentado a la Embajada de Israel y a la mutual israelita AMIA, entre otros), permitió diseñar nuevos métodos de análisis rápido y evaluar la eficiencia de los sistemas conocidos.

Finalmente, la identificación de secuencias ubicadas en el cromosoma Y humano y su distribución intra e interpoblacional, encarada en la Argentina por nuestro grupo como parte de un estudio a nivel mundial, constituyó un importante aporte a las ciencias forenses y antropológicas.

Estos sistemas, optimizados para su análisis en reacciones "multiplex", se emplean actualmente en casos de paternidad discutida sobre un hijo varón, cuando el supuesto padre no se encuentra disponible o se niega al estudio, analizándose cualquier hombre perteneciente a la misma patrilinea que el progenitor ausente: la coincidencia de las secuencias variables del cromosoma Y será total, de existir el vínculo biológico.

Resultan además de gran utilidad en el estudio de evidencias provenientes de delitos sexuales, donde puede establecerse el patrón genético del emisor del semen sin la habitual contaminación con el ADN de la víctima.

Este trabajo constituye un modesto aporte científico a la resolución de necesidades sociales encuadradas en el ámbito de la Justicia Civil y Criminal.

En su conjunto, el desarrollo de nuevas metodologías de análisis que hacen posible la identificación de individuos, restos humanos y rastros biológicos, constituye una nueva y valiosa herramienta forense.

La PGR logra identificación de dos osamentas de mujer gracias a los análisis de ADN.

La Procuraduría General de la República logró la identificación de dos de las 13 osamentas de mujer que son analizadas actualmente, gracias a los perfiles genéticos obtenidos de las muestras donadas por 26 familiares de víctimas en Ciudad Juárez.

Ciudad de México | Domingo 29 de febrero de 2004

Para lograr la identificación de estas osamentas fue necesario que los familiares de las occisas donaran muestras de saliva, sangre o cabello, informó la PGR.

Las muestras fueron procesadas por 19 peritos especializados, bajo modelos estadísticos, a través de maquinaria con sistemas tecnológicos de punta, cuya confiabilidad en el dictamen de asignación de parentesco genético es del 99.9 por ciento.

Las muestras tomadas de las osamentas y de los familiares de las víctimas han sido concentradas en el Banco de Datos de Genética Forense, en la ciudad de México, y

archivadas con papel FTA, que permite su conservación a temperatura ambiente por muchos años, además de que se cuenta con un archivo automatizado específico para los casos de los homicidios de mujeres en Ciudad Juárez.

Después de la puesta en marcha del banco de datos en Ciudad Juárez, se presentaron ante la Fiscalía Especializada para la Atención de Delitos Relacionados con los Homicidios de Mujeres, María López Urbina, ocho familiares más de las víctimas, quienes están dispuestos a donar muestras, y se espera que poco a poco más familiares se presenten para enriquecer el banco de datos e identificar las osamentas en un tiempo más corto.

Esta Fiscalía cuenta con un laboratorio en Ciudad Juárez, Chihuahua, en el que seis peritos especializados en odontología, criminalística, antropología, fotografía, balística, química y genética, respectivamente, se encargan de levantar los indicios localizados, así como de tomar las muestras a los familiares de las víctimas, mismos que son enviados a la ciudad de México para su análisis en el Banco de Datos de Genética Forense.

El método de identificación

Este banco, encargado de la obtención de los perfiles genéticos de las víctimas y de sus familiares, es dirigido por el químico Alfonso Luna, reconocido a nivel internacional e integrante del Grupo Iberoamericano en el Análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico).

Luna explica, según el comunicado, que el proceso para la obtención del perfil genético inicia con la recepción de las muestras forenses, luego se extrae el ADN, se cuantifica éste y se somete a la PCR, que es un tipo de clonación o fotocopia de sitios específicos de un cromosoma, cuya información es ingresada en una máquina llamada Abi Prism, con la que se obtiene el perfil genético de un individuo, lo que facilita la identificación de un cuerpo.

El tiempo promedio para analizar una muestra de sangre, saliva, semen y cabello, es de cuatro días, mientras que para el análisis de un hueso, se requiere mínimo un mes, debido a los procesos químicos a los que es sometida la muestra, de acuerdo con el químico Alfonso Luna.

Los costos

El costo de un estudio de muestras de padre, madre e hijo, es de aproximadamente 25 mil pesos y el mantenimiento del Banco de Datos de Genética Forense, que da servicio a las distintas áreas de la Procuraduría General de la República, es de más de medio millón de pesos mensuales, dependiendo del número de muestras a analizar. Y se cuenta con equipos

que tienen un valor estimado de 10 millones de pesos, sin los cuales sería imposible la obtención de un perfil genético.

El químico Alfonso Luna reconoce que la creación de este archivo para la investigación de homicidios de mujeres en Juárez, cuyo objetivo está basado en la identificación de un individuo a través del perfil genético, representa un beneficio ilimitado, ya que la información que se obtiene a partir del ADN es altamente confiable para establecer un sistema de identificación.

Además del esfuerzo humano que se realiza para el esclarecimiento de estos homicidios, la Procuraduría General de la República continúa con la voluntad de allegarse de maquinarias y técnicas cada vez más sofisticadas, que permitan la obtención de un dictamen en menor tiempo, para apoyar de manera más efectiva al Ministerio Público de la Federación.

Identificación del virus de bronquitis infecciosa por medio de la prueba de transcriptasa reversa-reacción en cadena por la polimerasa en papel de filtro FTA[®].

Se investigó la posibilidad de utilizar tarjetas de papel de filtro FTA[®] para almacenar líquido alantoide de las cepas Arkansas -DPI, Connecticut, y Massachusetts del virus de bronquitis infecciosa aviar. El objetivo fue el de identificar la presencia de estas cepas por medio de las pruebas de transcriptasa reversa -reacción en cadena por la polimerasa (de las siglas en Inglés RT-PCR), la caracterización por medio de la prueba del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (de las siglas en Inglés RFLP), o mediante la secuencia de nucleótidos. El papel de filtro FTA[®] es una membrana de algodón y celulosa que contiene químicos liofilizados que lisan muchos tipos de bacterias y virus. El virus de bronquitis se inactivó al entrar en contacto con el papel FTA[®], como se demostró por la incapacidad del virus de propagarse en embriones de pollo. La prueba RT -PCR del gen S1 demostró que el ARN viral permaneció estable al almacenamiento el papel FTA[®] y esa estabilidad fue sensible a la temperatura y al tiempo de almacenamiento para los oligonucleótidos de mayor tamaño (1700 pares de bases) pero no para los pequeños (383 pares de bases). El análisis de los productos amplificados mostró que es posible la caracterización molecular del virus en muestras almacenadas en el papel FTA[®], aún bajo condiciones ambientales desfavorables (41 C) por un mínimo de 15 días. El uso del papel de filtro FTA[®] para la toma, transporte y almacenamiento de muestras infectadas con el

virus de bronquitis es un procedimiento seguro, barato y adecuado para el diagnóstico molecular. Proponemos que las muestras que vengan del extranjero en papel FTA[®] sean analizadas primero por la prueba de RT-PCR utilizando iniciadores que produzcan nucleótidos de 1700 pares de bases, seguido de análisis por medio de la prueba de RFLP de los casos positivos. Los casos negativos se pueden analizar utilizando iniciadores que produzcan nucleótidos de 383 pares de bases (para descartar efectos dañinos debido a las condiciones de almacenamiento), seguido por la secuenciación de los casos positivos.

Inactivación, almacenamiento y detección de micoplasma mediante la prueba de la reacción en cadena por la polimerasa en filtros de papel FTA[®].

RESUMEN.

Se evaluó la factibilidad del uso de filtros de papel FTA[®] (Flinders Technology Associates) para la inactivación y almacenamiento de plantillas de ADN de micoplasma y su detección mediante la prueba de reacción en cadena por la polimerasa (PCR). Los filtros de papel FTA[®] consisten en una membrana de celulosa de algodón que contiene químicos liofilizados que destruyen la mayoría de bacterias y virus. Se depositaron varios volúmenes de cultivos de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) en los filtros de papel y se almacenaron a diferentes temperaturas por varios períodos antes de realizar la prueba de PCR. Se detectó la presencia de MG y MS durante todo el tiempo (1 -60 días) independiente del volumen aplicado en el filtro (1–100 µl) o la temperatura de almacenamiento (4° C a 41° C). Se observó una sensibilidad y especificidad similar entre la prueba de PCR empleando el filtro FTA[®] y la prueba estándar de PCR empleada en diagnóstico, permitiendo la detección de MG y MS en muestras de campo sin la interferencia de cepas inespecíficas de micoplasma. El análisis de 193 muestras de campo mediante los dos métodos mostró una concordancia cercana al 100% con los resultados de serología y cultivo. La estabilidad del ADN por períodos prolongados y en un amplio rango de temperaturas hacen de las tarjetas FTA[®] una buena alternativa para la toma e inactivación simultánea de micoplasmas. Además, ofrece la conveniencia del almacenamiento y transporte de ADN de forma económica para análisis moleculares incluyendo la prueba del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y la secuenciación.

2.2 SOPORTES DE PAPEL PARA COLECTA DE MUESTRAS.

2.2.1 PAPEL FTA.

En la actualidad se cuenta con la tecnología del papel FTA, es utilizada para coleccionar transportar y archivar todos los ácidos nucleicos a la temperatura del ambiente.

Las tarjetas FTA tecnología patentada por Whatman FTA, simplifican el manejo y el procesamiento de los ácidos nucleicos.

La tarjeta FTA contiene los químicos para lisar células, desnaturalizar proteínas, y proteger a los ácidos nucleicos de nucleasas, oxidación y daño por rayos UV.

Las tarjetas FTA vuelven inactivos rápidamente a los organismos, incluyendo los patógenos que lleva la sangre y previene el crecimiento de bacterias y otros microorganismos.

El principio de captura del ADN en el papel FTA es el siguiente . Las tarjetas FTA están impregnadas con una formula química patentada que lisa las membranas celulares y desnaturaliza proteínas. De esta forma los ácidos nucleicos son atrapados, físicamente siendo inmovilizados y estabilizados. Una vez inmóvil, el ácido nucleico queda protegido, de nucleasas, oxidación, daño bacteriano y hongos pudiendo ser almacenados a temperatura ambiente por años.

Características y beneficios .

- ❖ La captura de los ácidos nucleicos se realiza en un paso fácil.
- ❖ El ácido nucleico capturado esta listo para su aplicación en 30 minutos
- ❖ Los ácidos nucleicos recolectados en las tarjetas FTA son estables por años a temperatura ambiente.
- ❖ Las tarjetas FTA pueden ser guardadas a temperatura ambiente antes y después de su aplicación, reduciendo la necesidad de congeladores en el laboratorio.

- ❖ Es utilizable virtualmente para cualquier tipo de células
- ❖ La aplicación para las tarjetas FTA de cambio de color, es el de facilitar el manejo de muestras coloreadas
- ❖ Las tarjetas FTA están disponibles en varias configuraciones, según los requisitos de la aplicación.

Aplicaciones

- ❖ Forense
- ❖ Transgénicos
- ❖ Descubrimiento de drogas
- ❖ Análisis de STR
- ❖ Diagnóstico de la identificación animal
- ❖ Fármaco genomas

Método. Captura de los Ácidos nucleicos.

Al aplicar la muestra a la tarjeta FTA, las membranas celulares y organelos son lisados y es liberado el ADN. Se atrapan los ácidos nucleicos en las fibras del papel. Los ácidos nucleicos permanecen inmovilizados y se estabilizan para el transporte. El almacenamiento a temperatura ambiente es a largo plazo.

El ácido nucleico capturado estará listo para su aplicación en 30 minutos.

Los ácidos nucleicos capturados están listos para su purificación. Simplemente se toma una porción de la tarjeta FTA y se lava con el reactivo de purificación FTA, se enjuaga con el tampón TE-1, el ADN en la porción lavada está listo para usar en las aplicaciones como PCR, análisis de RFLP, y RT-PCR. Desde que los productos de PCR permanecen en la solución, la porción puede usarse para amplificaciones múltiples.

El ADN geonómico guardado en las tarjetas FTA, a temperatura ambiente por encima de los 14 años ha sido con éxito amplificado por PCR. Al contrario el genoma de ADN guardado a temperatura ambiente en papel no FTA, por encima de los seis meses no amplifico en PCR.

La integridad de la muestra se perfecciona cuando las tarjetas FTA se guardan en bolsas de multibarrera con un paquete de desecador.

Las tarjetas FTA ofrecen un sistema de almacenamiento compacto a temperatura ambiente, que reduce la necesidad de tener un congelador.

2.2.1. Tipos de tarjetas FTA.

FTA la tarjeta clásica

Consta de cuatro áreas para la aplicación de 500 a 100 ul de sangre entera que se siembran homogéneamente en la tarjeta.

Es conveniente para las aplicaciones múltiples de un mismo espécimen, o colección de muestras de animales o plantas en una tarjeta.

Pueden procesarse muestras diferentes independientemente

Con la tarjeta clásica indicador FTA. Igual que la tarjeta clásica FTA, pero con un indicador que cambia de color de rosa a blanco cuando la muestra es aplicada. Es recomendado en pruebas bocales o en cultivos celulares.

FTA tarjeta mini

Tiene dos áreas para la aplicación de la muestra, en una cantidad de 250 a 50 ul de sangre entera que se siembran homogéneamente en la tarjeta.

Es conveniente para protocolos que requieren situaciones diferentes por probar y archivar las muestras. Pueden procesarse muestras diferentes independientemente.

FTA tarjeta mini con indicador

Igual a la tarjeta mini pero con un indicador de color que cambia de rosa a blanco cuando la muestra es aplicado. Recomendado para el uso de muestras claras como bucal o cultivo celular.

Tarjeta FTA microscópica

Solo consta de un área para aplicar la muestra en una cantidad de 125 a 25 ul de sangre entera aplicada de manera homogénea sobre la tarjeta. Recomendado cuando solo se necesita una muestra.

FTA tarjeta microscópica con indicador

Igual a la FTA tarjeta microscópica pero con un indicador de color que cambia de rosa a blanco, cuando es aplicada la muestra. Recomendado para el uso de muestras claras como bucal o cultivo celular.

Tarjeta FTA gen

Es una tarjeta que incluye un marco rígido, tiene tres áreas para la aplicación de la muestra en cantidades de 225 a 30 ul que se siembran homogéneamente en la tarjeta. Puede utilizarse en sistemas de pipeteo automático.

Wathman son productos industriales de papel de calidad, desde 1740 y ha sido reconocido como líder mundial en productos con tecnología de separación de filtro.

Con todo este conocimiento y testimonios de calidad, los productos de Whatman han tomado un nuevo nivel en la genética.

Whatman a evolucionado en la industria con la nueva tarjeta FTA, una tecnología revolucionaria patentada con la cual podemos coleccionar, transportar, purificar y archivar ADN y ARN en una sola tarjeta almacenada a temperatura ambiente.

Los productos de preparación de muestras de ácidos nucleicos, incorporado por la tecnología Whatman, ofrece ventajas excelentes para la biología molecular. Esto

incluye encapsulación de medios de comunicación sólidos en los dispositivos, DNA, productos de separación y servicios diseñados para colección transporte, purificación y análisis de los ácidos nucleicos.

Todos estos nuevos productos Whatman crean aplicaciones de descubrimientos que rinden resultados exactos, lo más rápido posible, ofreciendo un extenso rango de productos principales y eficaces medios de servicio que procesan el ADN.

Whatman ofrece un extenso rango de productos para facilitar los estudios en genoma humano, animales, plantas y microorganismos. La colección, almacenamiento y análisis de ADN y ARN, tienen todo el beneficio del uso de la tarjeta FTA ².

El papel FTA es en conclusión un conjunto de reactivos liofilizados y patentados cuyo objetivo es extraer el material genético requerido de una manera fácil y que permita de igual manera una conservación de la muestra que no necesite de muchos cuidados.

A continuación mostramos en las siguientes figuras la forma de presentación de las tarjetas FTA. Figura 1.

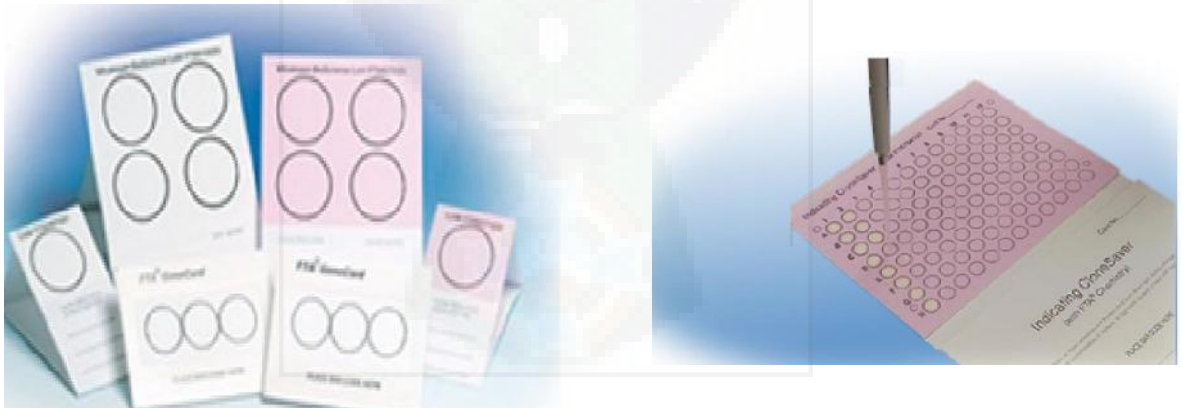


Figura 1. Presentaciones del Papel FTA (Flinders Technology Associates)

² <http://www.whatman.com/products/?pageID=7.31.31> (2 of 3)27/08/2004 15:12:27

2.2.2. PAPEL NUCLEICO

Papel Nucleico B161- 5 (5 x 6 muestras)

Descripción:

El papel Nucleico es un soporte para todo tipo de muestras que esta debidamente tratado para conservar ADN de fluidos biológicos para su posterior amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

El papel Nucleico al igual que en el caso del papel FTA, lleva en su composición una serie de reactivos liofilizados y patentados que tienen la función de liberar el material genético de las células recolectadas en el mismo, con ayuda del calor.

Presentación:

El papel Nucleico se presenta en 5 tarjetas cada una con espacios para recolectar hasta 6 muestras.

Utilización:

Archivo de la muestra

Pipetear dentro de cada círculo 20 a 25µl del fluido biológico (sangre, saliva, etc.). Para muestras sólidas (hojas, tejidos animales, etc.) presionar sobre el papel girando suavemente.

Nota: Si bien es improbable que exista contaminación cruzada entre los distintos círculos, se recomienda utilizar tarjetas separadas para muestras críticas o de riesgo.

Dejar secar a T° ambiente 30 a 60 minutos.

Archivar en un lugar seco a T° ambiente (ej.: una carpeta o un cuaderno).

Amplificación de la muestra

Tomar con un sacabocados una sección de 2mm de diámetro de papel con muestra. Colocar la porción de papel en un microtubo con 500µl de agua. Vortexear 5 segundos. Transferir el

papel a un nuevo microtubo con 100µl de agua. Calentar a 95°C durante 30 minutos. Breve centrifugación. Utilizar 5 a 20µl de la solución como templado de la PCR.

Es altamente aconsejable utilizar el templado inmediatamente después de la purificación. El congelado del mismo puede reducir significativamente el resultado de la reacción de PCR.

En el caso de muestras de sangre. Obtener una gota de sangre con una lanceta y sembrar directamente, evitando en lo posible el contacto con la piel.

Alternativamente, coleccionar en un tubo y luego sembrar con una pipeta. Es indistinto utilizar sangre entera o con anticoagulante (en este caso, preferentemente utilizar EDTA).

Para el caso de cultivos bacterianos (minipreps). La obtención de la muestra se realiza a partir de placas: tomar una colonia con la ayuda de un tip. Introducir el tip en 20 µl de agua. Calentar 95°C 2 minutos (opcional). Sembrar la solución en el papel.

A partir de suspensiones: Sembrar directamente en el papel.

En el caso de recolección de muestras de plantas se debe rotar una porción de la hoja sobre el papel hasta obtener un color verde. Dejar secar unos minutos y continuar con el lavado, según el protocolo. Conservación: T° Ambiente³

2.3 OTROS SOPORTES

TIPO DE SOPORTE DE LA MANCHA

ABSORVENTE ABSORVENTE

Tela
Gasa
Lona

PARCIALMENTE ABS.

papel
colillas
piso de cemento

NO

pinza metálica
porta objeto
automóvil (carrocería)

³ Biodynamics SRL Av. De Mayo 1370 P.15 Torre – (C1085ABQ) Cdad. de Buenos Aires.
Te: 11-4383-3000 FAX: 11-4384-7316 info@biodynamics.com.ar www.biodynamics.com.ar
v10/04

Papel filtro

madera

jeringa

PAPELES ESPECIALES

Papel FTA

Papel Nucleico

3. MARCO TEORICO REFERENCIAL

3.1. MOLECULA DE ADN.

El ADN es la molécula de la herencia, además es el constituyente fundamental de los cromosomas y sobre todo es la base de la vida.

El ADN posee unidades variables (bases nitrogenadas), que se encuentran en una localización determinada en la secuencia de la cadena polinucleotídica. Esto es importante ya que la información se secuencia según la ubicación de las unidades en la cadena.

Es suficientemente estable por lo que la información que contiene se conserva y transmite de manera segura, para la construcción correcta de las proteínas, determinando así su estructura y función biológicas.

Y puede duplicarse para que dos células hijas, tengan toda la información contenida en la célula madre⁴. Ver la Figura. 2.



Figura. 2. Molécula de ADN

3.2. ESTRUCTURA DEL ADN.

El ADN es un largo polímero no ramificado. Sus unidades monoméricas se conocen como nucleótidos, por lo tanto el polímero se denomina poli nucleótido. Los componentes moleculares del poli nucleótido son:

- Azúcar de 5 átomos de carbono: 2-desoxirribosa
- Bases nitrogenadas: purinas (adenina y guanina) y pirimidinas (timina y citosina)
- Grupo monohidrogeno fosfato.

Las fuerzas que unen ambas hebras, son puentes de hidrogeno y se establecen con una alta especificidad.

Estos hechos los explica el modelo de la doble hélice, desarrollado por Watson y Crack (1962, Premio Nobel de Medicina y Fisiología).

La especificidad de esta unión proviene de dos factores:

Tamaño de las bases nitrogenadas (factor estérico) y capacidad de las mismas para formar puentes de hidrogeno.

Las bases nitrogenadas T y A pueden unirse entre si por dos puentes de hidrogeno mientras que G y C pueden unirse de manera similar pero mediante tres puentes de hidrogeno.

El número de anillos de las bases nitrogenadas es importante por que una un ión entre dos bases púricas podría provocar que los dos polímeros de ADN que forman el espiral se separen inestabilizando el ADN⁵. Ver la Figura. 3

⁵ Luque: Biología Molecular e Ing. Genética, Pág. 9 - 17

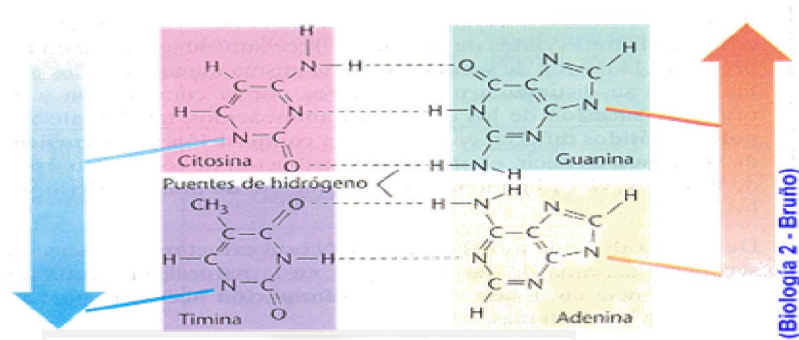


Figura. 3 Estructura molecular de DNA

3.3. ADN DESDE EL PUNTO DE VISTA ANALITICO.

La detección de una secuencia de bases específica en ácidos nucleicos de humanos, virus y bacterias ha generado mucho interés en la determinación de causas de enfermedades genéticas, contaminación de alimentos por organismos y en investigaciones forenses y medioambientales. Los organismos patógenos responsables de enfermedades (bacterias, virus) pueden detectarse por su secuencia única de ácidos nucleicos.

Por esta razón se ha llegado a estudiar los sitios de interacción entre las moléculas y el ADN.

Los iones y las moléculas interactúan con el ADN de tres maneras. Ver la figura 4.

La primera consiste en la unión electrostática a lo largo del exterior de la doble hélice de ADN mediante las cargas negativas de los grupos fosfato del mismo. Esta interacción es inespecífica y puede ocurrir tanto en dsADN y ssADN.

La segunda es la unión hidrofóbica con los bordes de las bases nitrogenadas que quedan más expuestas en los surcos mayores y menores de la doble hebra.

La tercera y más específica es la intercalación, que consiste en la incorporación de moléculas orgánicas con sistemas de anillos aromáticos planares denominadas intercalantes (bromuro de etidio) entre los pares de bases nitrogenadas ⁶.

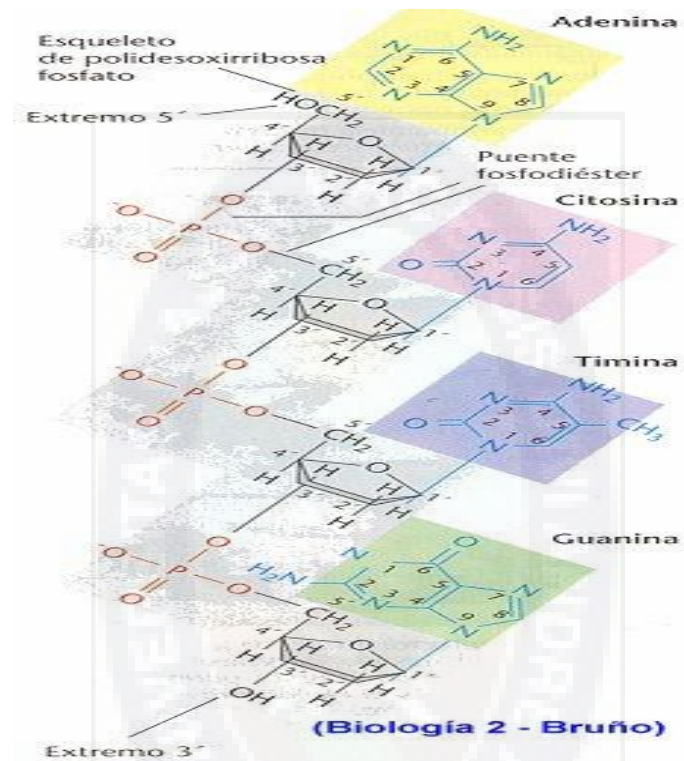


Figura 4. Lugares de interacción de otras moléculas con la molécula de ADN

3.4. ADN DESDE EL PUNTO DE VISTA BIOLÓGICO Y FUNCIONAL

La molécula de ADN debe cumplir tres funciones biológicas fundamentales:

Debe duplicarse antes de la división celular de manera que cada célula viva reciba la misma información genética cualitativa y cuantitativa (replicación del ADN).

Un gen contiene información biológica que debe copiarse exactamente y transmitirse desde cada célula a todas sus células hijas. Como cada hebra contiene una secuencia de nucleótidos que es exactamente complementaria a la secuencia de nucleótidos de la otra

⁶ Timothy: Biología Molecular, Pág. 25 - 37

hebra, debe notarse que en realidad ambas hebras contienen la misma información genética; si se considera una secuencia como una palabra, dos secuencias complementarias serían dos palabras distintas que quieren decir lo mismo. Si denominamos a las dos hebras 1 y 1' la hebra 1 puede servir como molde para producir una nueva hebra 1' y viceversa; así la información genética puede ser copiada mediante un proceso en el que la hebra 1 se separa de la hebra 1' permitiendo que cada una de ambas hebras sirva de patrón para la producción de una nueva doble hebra idéntica a la original.

El mecanismo de replicación es complicado, interviniendo un complejo de proteínas que forman una maquinaria de replicación.

La reacción fundamental se basa en la adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de la cadena de ADN catalizada por una enzima, la ADN polimerasa. Cada nucleótido añadido a la cadena es, en realidad, un desoxirribonucleótido trifosfato; la separación del pirofosfato de este nucleótido activado y su hidrólisis posterior, proporcionan la energía necesaria para la reacción de replicación del ADN, convirtiéndola en una reacción irreversible.

La replicación de una hélice de ADN empieza por la separación local de sus dos hebras de ADN complementarias. Cada hebra luego es un patrón para la formación de una nueva molécula de ADN, mediante la adición secuencial de desoxirribonucleótidos trifosfato, generándose así una hebra hija de ADN que tiene una secuencia complementaria a la de la hebra patrón. La información genética se duplica en su totalidad, es decir, se llegan a formar dos dobles hélices completas de ADN, cada una de las cuales es idéntica en cuanto a la secuencia de nucleótidos a la hélice de ADN madre que sirvió de patrón. Debido a que al acabar el proceso cada doble hélice de ADN hija es formada por una

cadena original y otra recién sintetizada, se dice que el mecanismo de replicación es semiconservativo.

Una de las características más importantes de la replicación es su exactitud. Se utilizan diversos mecanismos correctores para eliminar nucleótidos situados incorrectamente. Pero puede ocurrir que la maquinaria de replicación salte o añada algunos nucleótidos o coloque una base diferente a la que correspondía. Cada uno de los cambios de este tipo en la molécula de ADN constituye un error genético llamado mutación, que será copiado en todas las generaciones futuras de células. Como los genes se expresan en proteínas, una mutación puede provocar que se sintetice una enzima inactiva o con problemas funcionales. Sin embargo la mutación es uno de los principales mecanismos de evolución, mediante el cual han aparecido nuevas especies y grupos taxonómicos.

Como la información genética debe estar en un medio seguro (núcleo celular), es conveniente que transfiera su información a otro tipo de molécula que pueda salir al exterior (citoplasma celular). Esta molécula se denomina ARN y a este proceso de transferencia de información del ADN al ARN se denomina transcripción.

La molécula de ADN es relativamente inerte desde el punto de vista químico. La información que contiene se expresa indirectamente a través de otras moléculas; el ADN dirige la síntesis de ARN específicos y así de moléculas de proteínas que determinan las propiedades físicas y químicas de la célula.

Tanto el ADN como las proteínas están compuestos por una secuencia lineal de subunidades y se ha demostrado que los nucleótidos del ADN están dispuestos en un orden que corresponde al orden de los aminoácidos de la proteína que especifican. Es evidente que la molécula de ADN contiene una especificación codificada de la secuencia proteica.

La síntesis de proteínas implica copiar regiones específicas del ADN; los genes en otro tipo de polinucleótido química y funcionalmente diferente: el ARN está compuesto por una secuencia lineal de nucleótidos, pero presenta dos diferencias químicas respecto al ADN.

- El esqueleto de azúcar y fosfato del RNA contiene ribosa en lugar de 2-desoxirribosa
- La base Timina está sustituida por Uracilo

El ARN contiene toda la información de la secuencia del ADN de la que ha sido copiada y mantiene las propiedades del ADN de apareamiento de bases. Las moléculas de ARN se sintetizan a través de un proceso conocido como transcripción del ADN, que en muchos casos se parece a la replicación del ADN. Ya que una de las dos hebras de ADN actúa como patrón, sobre la que se sintetiza la molécula de ARN mediante adiciones sucesivas de ribonucleótidos.

La transcripción se diferencia de la replicación en varios puntos importantes

- El ARN producido no permanece asociado al ADN. Inmediatamente detrás de la región en la que se añaden los ribonucleótidos, la hélice de ADN se forma de nuevo y la molécula de ARN se separa.
- Las moléculas de ARN son relativamente cortas en comparación con las de ADN ya que son copiadas a partir de una región limitada de ADN. Se transcriben únicamente uno o varios genes suficientes para producir una o varias proteínas.
- Las moléculas de ARN no solo se encuentran en el núcleo celular
- Existen varios tipos de moléculas en las que se puede encontrar ARN, con funciones biológicas diferentes. A los transcriptos de ARN que dirigen la síntesis de

proteínas se le llama moléculas de ARN mensajero, mientras que a los otros transcritos de ARN actúan como ARN de transferencia o forman los componentes de ARN de los ribosomas.

- La cantidad de ARN sintetizado a partir de una región determinada de ADN esta controlada por proteínas reguladoras de la actividad genética, que se unen a lugares específicos del ADN cerca de las secuencias codificadas de un gen. En cualquier célula, en cualquier momento, algunos genes se están utilizando para sintetizar ARN en grandes cantidades por ejemplo frente a una infección bacteriana, mientras que otros genes no se transcriben en absoluto.

En la células sin embargo se descubrió que la mayoría de los genes eucarióticos, presentan secuencia codificantes llamadas exones, interrumpidas por secuencias no codificantes llamadas intrones.

Para producir una proteína primero se transcribe todo el gen, incluyendo sus intrones y sus exones, generando una molécula muy larga de ARN llamado transcripto primario. Antes de que la molécula de ARN abandone el núcleo, un complejo de enzimas procesadoras de ARN eliminan todas las secuencias de intrones produciendo una molécula de ARN mucho mas corta.

Después de que esta maduración de ARN llamada maduración por corte y empalme del ARN haya concluido, la molécula de ARN se desplaza al citoplasma, constituyendo una molécula de ARN mensajero que dirige la síntesis de una molécula de proteína, determinada en su secuencia.

Como las moléculas funcionales en los seres vivos son las proteínas, la información codificada en el ARN debe transferirse a su forma operativa, la proteína. A este proceso se denomina traducción⁷.

Las reglas a través de las que se traduce la secuencia nucleotídica, en la secuencia de aminoácidos de una proteína se denomina código genético, fueron descifradas a principios de 1960. Se demostró que la secuencia de nucleótidos de ARN que actúa como intermediario era leída en orden consecutivo y en grupos de tres. Cada triplete de nucleótidos denominada codón, determina un aminoácido.

Puesto que el ARN es un polímero lineal de 4 nucleótidos diferentes existen 64 posibilidades de tripletes para formar otros tantos codones posibles. Habitualmente en las proteínas solo se encuentran 20 aminoácidos, diferentes de modo que la mayoría de los aminoácidos debería ser especificados por varios codones, a este fenómeno se denomina código genético degenerado. El código ha sido altamente conservado a través de la evolución: con pocas excepciones, es igual en organismos tan diversos como las bacterias, las plantas y el hombre.

La traducción de un ARNm a proteína depende de una molécula adaptadora que reconoce un aminoácido y un grupo de tres nucleótidos. Estos adaptadores son un grupo de pequeñas moléculas de ARN conocidas como ARN de transferencia (ARNt), cada una de las cuales tiene alrededor de 80 nucleótidos de longitud. En la molécula de ARNt (que poseen una hebra), los pares de bases complementarias se forman entre residuos de nucleótidos de la misma cadena, lo cual hace que la molécula de ARNt se pliegue de una manera característica (como un cruce en trébol), que es importante en su función de adaptador. En la molécula existen dos grupos de residuos de nucleótidos desapareados, que son

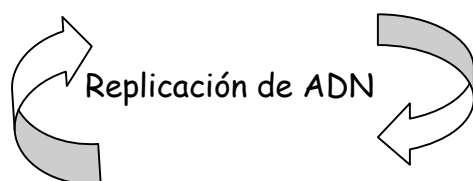
⁷ Luque: Biología Molecular e Ing. Genética, Pág. 187 - 302

especialmente importantes para la función en la síntesis de proteínas: uno de los grupos forma el anticodón, cuyas bases pueden aparearse con las de un triplete complementario de una molécula de ARNm (el codón), mientras que en el extremo 3' de la molécula existe una secuencia CCA que está unida de forma covalente a un aminoácido.

Finalmente el ARNm es traducido a una proteína a través de un complejo conjunto de reacciones que tiene lugar en el ribosoma, que es un complejo de más de 50 proteínas diferentes asociadas a varias moléculas de ARN ribosomal (ARNr).

Cada ribosoma funciona como una gran maquinaria sintetizadora de proteínas en la que también intervienen las moléculas de ARNt y también las moléculas de ARNt (que poseen codificada la información genética). El ribosoma se fija primero en un punto específico de la molécula de ARNm (codón de iniciación), que establece la pauta de lectura y determina el extremo amino terminal de la proteína. Luego a medida que el ribosoma se desplaza a lo largo de la molécula de ARNm, va traduciendo, codón a codón, la secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos, utilizando moléculas de ARNt para añadir aminoácidos al extremo por el que la cadena polipeptídica está creciendo. Cuando un ribosoma llega al final de un mensaje, tanto él como el extremo carboxilo de la proteína recién sintetizada, se libera del extremo 3' de la molécula de ARNm al citoplasma. Los ribosomas funcionan con una eficacia notable: en un segundo un solo ribosoma bacteriano añade aproximadamente unos 20 aminoácidos a una cadena polipeptídica en formación.

Las tres funciones biológicas fundamentales de la molécula de ADN que ya fueron descritas anteriormente, son ilustradas en la figura 5.



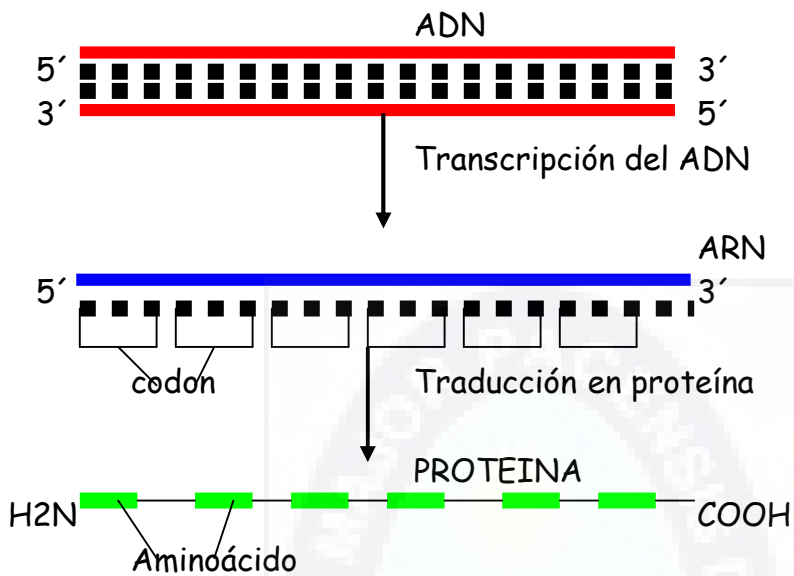


Figura. 5. Replicación, Transcripción y Traducción de la molécula de ADN.

3.5 REGIONES MICROSATELITES DEL GENOMA HUMANO

El estudio de marcadores polimórficos del ADN se ha convertido en una herramienta imprescindible en el análisis genético de vestigios biológicos de interés forense, así como la investigación biológica de la paternidad.

El descubrimiento a principios de los 90 de un gran número de regiones microsatélites o STR en el genoma humano permitió superar anteriores limitaciones. Los STR son regiones altamente polimórficas compuestas por una secuencia de 2 a 7 pb que se repiten en tandem, siendo precisamente la variación en el número de veces que se repite la unidad de secuencia la base de su polimorfismo genético.

Debido a que el tamaño de los alelos de los STR es generalmente menor a 350 pb, son susceptibles de ser analizados mediante técnicas de amplificación genética PCR, lo que permite trabajar con muestras del orden de pico gramo y en avanzado estado de descomposición.

Los microsatélites o STR son regiones de ADN repetitivo que se encuentran repartidas a lo largo de todo el genoma como media, un microsatélite por cada 5000 a 10 000 pares de bases y están compuestos por una secuencia de 2 -7 pb que se repite en tandem. Un gran número de estas regiones STR presenta un alto grado de polimorfismo genético de longitud cuya base molecular es la variación en el número de unidades de repetición. Los STR polimórficos se encuentran tanto en las regiones génicas como extra génicas del genoma humano. Los STR localizados en regiones génicas se presentan tanto en intrones y en regiones flanqueantes como en regiones codificantes.

3.5.1 CROMOSOMA Y

El complemento cromosómico humano está compuesto por 46 elementos organizados en 23 pares; de los cuales, 22 son semejantes en hombres y mujeres, denominándose Cromosomas autosómicos. El par restante, es el par sexual.

El sexo femenino tiene el par sexual constituido por dos elementos homólogos de morfología semejante. Sin embargo, en los hombres el par correspondiente tiene elementos disímiles, formado por un cromosoma metacéntrico mediano y un pequeño cromosoma acrocéntrico. El primero, denominado *Cromosoma X* es el elemento presente en doble

dosis en las mujeres, en tanto que el segundo, sólo presente en los varones, es el *Cromosoma Y*.

El varón, podrá generar dos tipos de espermatozoides que diferirán en cuanto a la presencia de un *Cromosoma X* o de un *Cromosoma Y*, además de los 22 elementos autosómicos.

Por lo tanto el hombre es quien determina el sexo de su descendencia.

En el hombre, tanto el *Cromosoma X* como el *Y* se encuentran como elementos únicos siendo su condición hemicigótica.

Ciertas características exhibidas por el *Cromosoma Y* lo hacen particularmente útil para estudios de vínculo de parentesco así como de análisis de evidencias forenses.

3.5.1.1 Estructura y Características del Cromosoma Y en el rastreo de línea paterna

Comenzaremos diciendo el significado de ADN patrilineal; es el material genético heredado del padre varón y exclusivamente transferido a los hijos varones. Ver la figura 6.

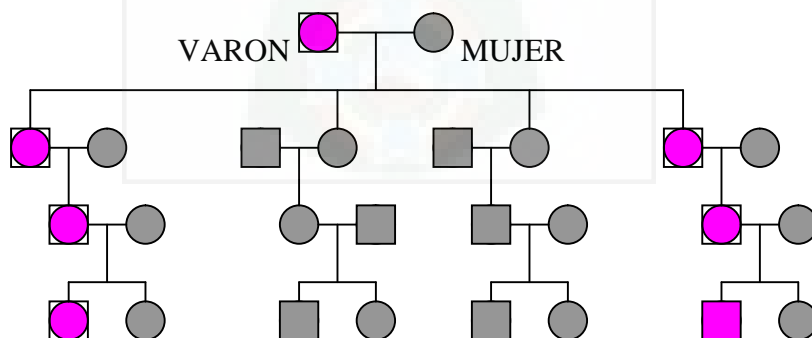


Figura 6. Herencia patrilineal

El *Cromosoma Y* es un elemento acrocéntrico pequeño que sólo representa el 2% del complemento cromosómico. Contiene alrededor de 6.107 pares de bases. El 60% de este ADN está constituido por secuencias polimórficas, altamente repetidas, y está confinado principalmente a la porción heterocromática del brazo largo, desde Yq13 a Yqter, y a la región pericentromérica, sugiriendo que estas regiones tendrían una funcionalidad limitada. Debido a la falta de un elemento homólogo (lo que determina una haploidía parcial), la mayor parte del *Cromosoma Y* no se recombina durante la meiosis. Sólo se produce recombinación con el *Cromosoma X* en dos pequeñas regiones pseudoautosómicas denominadas PAR1 y PAR2. La falta de recombinación determina que todas las secuencias ubicadas en esta zona se hereden como un bloque constituyendo un grupo de ligamiento. Y dado que en este grupo de ligamiento se localizan secuencias polimórficas, éstas serán cedidas de padres a hijos en forma obligada. En la Figura 7 se representa esquemáticamente la estructura y el bandeo G del *Cromosoma Y* humano, indicando las regiones en las que puede producirse recombinación, Par 1 y Par 2, y las regiones de Eu y Heterocromatina.

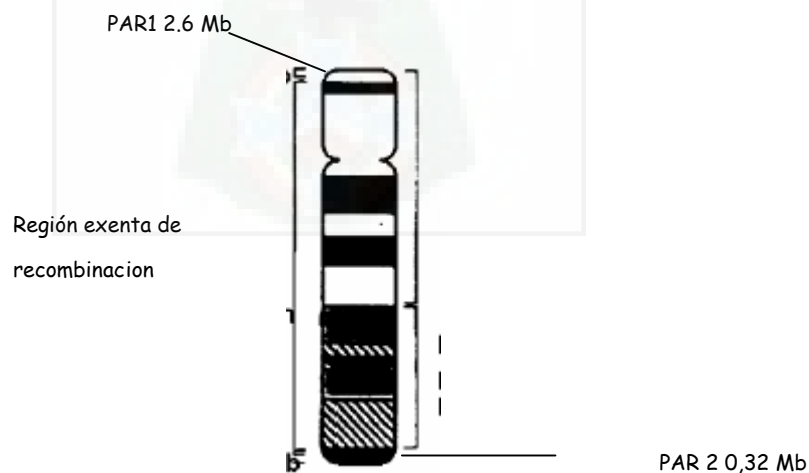


Figura 7: Bando G del cromosoma Y humano. La recombinación entre cromosoma Y y X solamente ocurre en dos regiones pseudoautosómicas (PAR1 y PAR2). Se indica la dimensión aproximada (en millones de pares de bases o Mb de cada región considerada).

BANDEO G.

Técnica para teñir cromosomas metafásicos. Los cromosomas se tratan con enzimas proteolíticas y se tiñen con el colorante de Giemsa produciéndose un patrón de bandeo. Las bandas se relacionan con regiones ricas en adeninas y timinas.

BANDAS G PALIDAS	BANDAS G OSCURAS
ADN rico en G C	ADN rico en A T
replicación temprana	replicación tardía
Muchos genes	Pocos genes

3.5.1.2 Las Regiones Polimórficas Presentes en el Cromosoma Y.

En el cromosoma Y existen secuencias polimórficas cuya variabilidad es reflejada en variantes de longitud, como es el caso de los microsátélites y los minisátélites en los que las unidades de repetición pueden variar tanto en número como en secuencia.

Además de éstas, existen otras variantes como las de inserción/delección, de las cuales las más importantes son los elementos YAP *Alu* y también simples sustituciones nucleotídicas.

Los polimorfismos en este cromosoma proveen de una herramienta adicional en las metodologías de la identificación humana. Los microsátélites hipervariables han contribuido en gran medida en este campo debido al gran número de tales marcadores disponibles, los que han sido ya validados en el ámbito forense internacional.

La posibilidad de determinar vínculos de filiación en ausencia del progenitor, la investigación de la identidad y sexo en desastres en masa y la identificación de responsables en casos de violación tanto hetero como homosexual, son algunos de los campos de aplicación forense de los marcadores de microsatélites del cromosoma Y⁸.

Antecedentes del Empleo de Marcadores Hipervariables del *Cromosoma Y* en la

Identificación Forense. Los estudios iniciales fueron enfocados hacia la región denominada Y27H39 (conocida actualmente como DYS19), que demostraron su utilidad tanto en estudios antropológicos como en análisis de paternidad en ausencia de progenitor masculino⁹.

En la Tabla 1 podemos observar las características presentes en algunos de los marcadores variables del *Cromosoma Y*

Tabla 1 Características de los marcadores variables del *Cromosoma Y*¹⁰

Y - STR	Localización	Nro. Acceso Gen Bank	Secuencia repetida
DYS 394	Yq	G09613	TCTA
DYS 389 I/II	Yq	AF140635	[TCTG] [TCTA] complejo
DYS 439	Yq	AC002992	GATA
DYS 393	Yp	G09601	AGAT
DYS 390	Yq	AC011289	[TCTG] [TCTA] complejo
DYS 385 a/b	Yq	Z93950	GAAA
DYS 438	Yq	AC002531	TTTC
DYS 437	Yq	AC002992	[TCTA] [TCTG] complejo

⁸ www.Informedica.org/2004

⁹ LA HUELLA DEL ADN EN LA INVESTIGACIÓN FORENSE. L. Borjas, S Revollo, S. Gomez, D Corach. Pp 120 – 130.

¹⁰ Venancio, G: 12 Marcadores del Cromosoma Masculino en la Investigación Criminal

DYS 19	Yp	X77751	TAGA complejo
DYS 392	Yq	G09867	TAT

En la tabla 2 podemos observar los primers pertenecientes a los marcadores más importantes del *Cromosoma Y*.

Tabla 2. Secuencia de cebadores usados para amplificar cada sistema

SISTEMA	SECUENCIA DE CEBADORES
DYS19 (Locus GDB: 121409)	Primer 1 5'CTACTGAGTTTCTGTTATAGT 3' Primer 2 5'ATGGCATGTAGTGAGGACA 3'
DYS385 (Locus GDB: 316257)	Primer 1 5'AGCATGGGTGACAGAGCTA3' Primer 2 5'GGGATGCTAGGTAAGCTG 3'
DYS389 I/II (Locus GDB:366108)	Primer 1 5'CAACTCTCATCTGTATTATCTATG3' Primer 2 5'TCTTATCTCCACCCACCAGA 3'
DYS390 (Locus GDB: 366115)	Primer 1 5'TATATTTTACACATTTTTGGGCC3' Primer 2 5'TGACAGTAAAATGAACACATTGC 3'
DYS393 (Locus GDB: 456649)	Primer 1 5'GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATAC 3' Primer 2 5'AACTCAAGTCCAAAAAATGAGG3'

3.6. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

3.6.1. Fundamento

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta,

dejando transcurrir cierto tiempo, las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión. La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo. Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento como un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido¹¹. Como se observa en la figura 8.

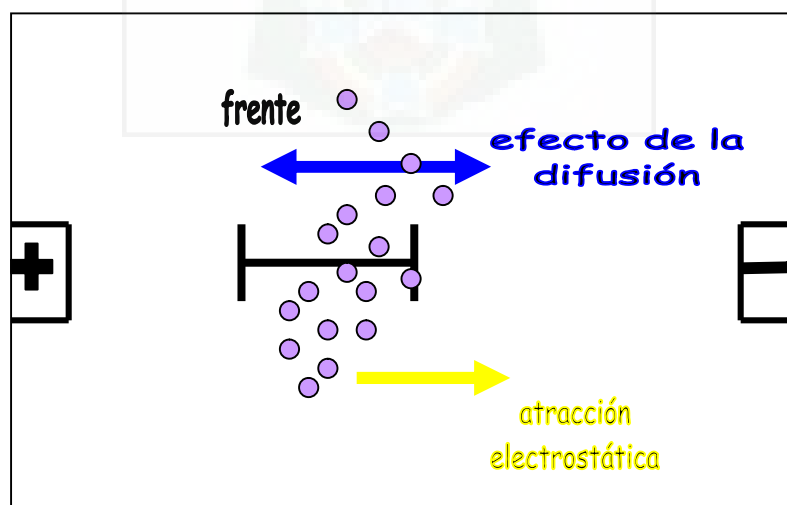


Figura 8. Fundamento de la electroforesis

La migración de las moléculas en las electroforesis se ilustra en la figura 9

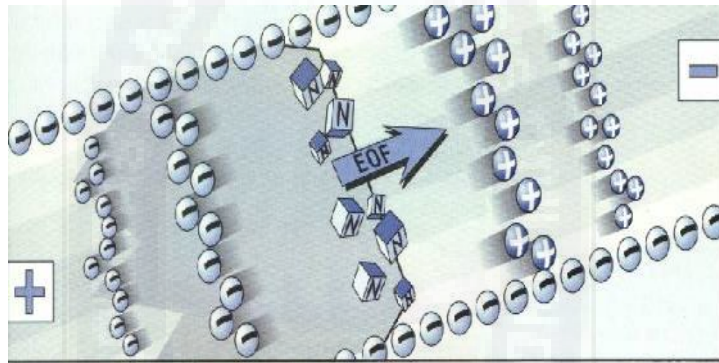


Figura 9. Migración de las moléculas durante una electroforesis

3.6.2 Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible.

Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un

tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnóstico debido a su neurotoxicidad.

Los geles de poliacrilamida constituyen como ya se mencionó un excelente medio de soporte para las separaciones electroforéticas dado que reúnen una serie de propiedades idóneas como transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos.

La poliacrilamida se forma por copolarización de dos compuestos, la acrilamida y la bisacrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletilendiamina TEMED y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa el monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad, bastante uniforme que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Las soluciones de acrilamida se desgasifican ya que el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato de amonio y TEMED.

La porosidad del gel se determina por las proporciones relativas de acrilamida y bisacrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.

El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Por lo general los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que contienen por esta razón los ácidos nucleicos se separan en un rango de 3 a 10 %

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una electroforesis vertical que ilustraremos en la figura 10.

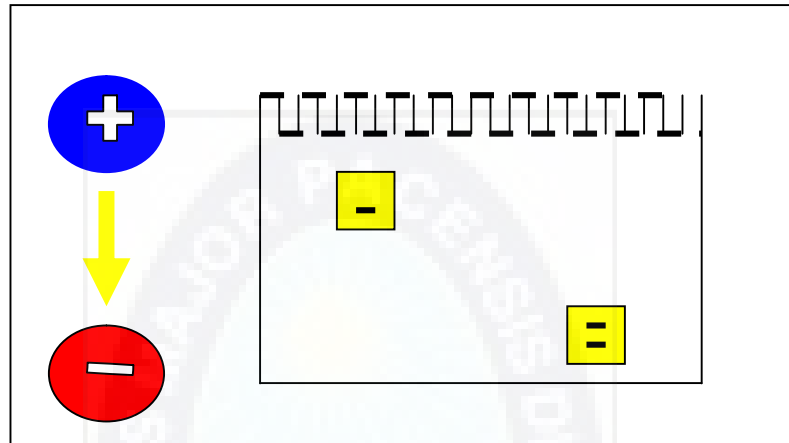


Figura. 10. Electroforesis vertical

3.6.3 Electroforesis en Gel de Agarosa

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 grados Centígrados y formar un gel, semisólido al enfriarse.

Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se usa

usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20.000 nucleótidos. En la tabla 1 podemos ver las concentraciones de agarosa que se requiere par la separación de ADN.

Tabla 3. Concentraciones optimas de agarosa

GEL %	SEPARACION OPTIMA (pb)	BUFFER RECOMENDADO
1%	500 – 2000	TBE
2%	250 – 750	TBE
3%	125 – 500	TBE
4%	20 - 250	TBE

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las diferentes macromoléculas, cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico.

Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas, negativamente debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La naturaleza del enlace fosfodiéster de la cadena polinucleotídica condiciona la carga de un ácido nucleico, que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato.

La electroforesis en geles de agarosa se realiza en cubetas apropiadas, generalmente horizontales, y requiere dos elementos fundamentales: la fase móvil y la fase estacionaria.

La fase móvil es el medio amortiguado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico.

La fase estacionaria o soporte es un polímero de naturaleza gelatinosa con un tamaño de poro homogéneo que se haya sumergido y embebido en la fase móvil. El polímero utilizado para el análisis electroforético de ácidos nucleicos de gran tamaño (100 pb – 10 kb) es la agarosa.

La migración de ácidos nucleicos en el gel de agarosa sometido a un campo eléctrico depende del voltaje del campo como del tamaño del poro del gel de agarosa. La separación efectiva de los fragmentos de ADN y ARN (resolución), depende tanto de la masa como de la carga de los distintos fragmentos, en realidad de la relación carga/masa. Transcurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección.

La tinción con bromuro de etidio, como ya sabemos es un agente intercalante que nos ayuda a observar los fragmentos de ADN.

Los agentes intercalantes son compuestos que se insertan entre las bases de una molécula de ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de bases de las cadenas complementarias.

El bromuro de etidio es un colorante que fluoresce cuando se encuentra unido al ADN de doble cadena $C_{21}H_{20}N_3Br$ (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridium Bromide; Homidium Bromide). Induce citotoxicidad al intercalarse en el surco mayor de la hélice de ADN, con lo cual se altera la síntesis de ADN y su transcripción.

Este agente fluorescente permite visualizar el ADN a través de un transiluminador con luz UV, es un método generalizado de detección de fragmentos de ADN.

A continuación podemos observar la figura 11 que representa los pasos a seguir en la electroforesis en gel de agarosa.

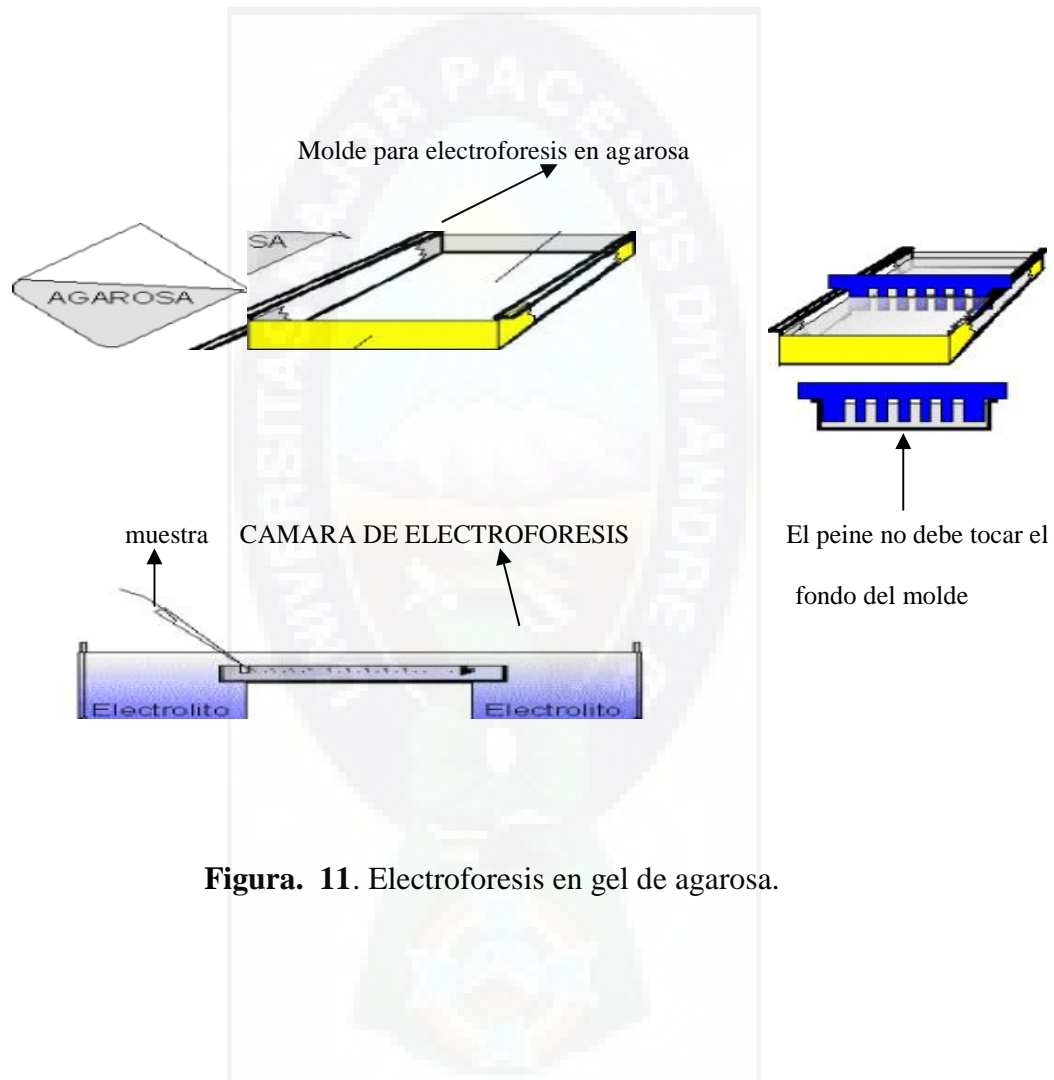


Figura. 11. Electroforesis en gel de agarosa.

3.7. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

En 1983 Kary Mullis (Premio Nobel de Química, 1993) ideó una metodología para duplicar hebras de ADN de manera artificial, que cambió el curso de la biología molecular.

El concepto de la amplificación del ADN por PCR es muy simple, pero su impacto ha sido extraordinario por ser una, metodología rápida, económica y un medio sencillo para la obtención de microgramos de ADN a partir de cantidades indetectables por los métodos utilizados hasta el momento.

Debido a la PCR cantidades ínfimas o insuficientes de ADN dejaron de ser una limitación para procedimientos de diagnóstico e investigación del ADN.

La PCR es una técnica de síntesis enzimática (*in vitro*) de secuencias definidas de ADN por la extensión simultánea de cebadores (primers) complementarios a las hebras de ADN de la muestra. La reacción utiliza dos oligonucleótidos (cebadores) que se hibridan a las cadenas complementarias de ADN de manera que flanquean la secuencia de ADN que se desea amplificar. La elongación de los cebadores es catalizada por una enzima llamada Taq ADN polimerasa, cuya característica principal es ser estable al calor. Se aísla de una bacteria termófila (*Thermus aquaticum*). La ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de ADN en la dirección 5' ----- 3' usando una hebra simple de molde, pero comenzando su polimerización, desde una región de doble hebra, en donde se ha hibridado el cebador complementario a esa región. Esta es la región de extensión del cebador.

PCR utiliza el mismo principio, pero emplea dos cebadores, uno complementario a una de las hebras de ADN y el otro complementario a la otra hebra de ADN, que han sido separadas de su estructura de doble hélice por calor. Los cebadores se seleccionan de manera tal que la polimerización a partir de cada cebador se dirige hacia el sentido donde se encuentra el otro, es decir, los cebadores deben hibridarse en la posición 5' de cada una de las hebras de ADN flanqueando la región a amplificar. Resultando la síntesis de novo de la región de ADN flanqueada por los dos cebadores.

PCR es entonces una metodología analítica que se realiza por repetición de un ciclo que involucra tres pasos:

- La separación de las dos hebras complementarias de ADN, analito que sirve de molde.
- Hibridación de los cebadores
- Extensión de los mismos por la Taq ADN polimerasa

Los pasos de cada ciclo se consiguen variando la temperatura de la mezcla de reacción. Resultando la acumulación del fragmento específico de ADN que se desea amplificar flanqueada por los dos cebadores.

Debido a que el producto generado por extensión de los cebadores sintetizado, durante un ciclo determinado puede servir como ADN analito en el próximo ciclo, el número de copias de la secuencia de interés aproximadamente se dobla durante cada ciclo. Entonces 20 ciclos de PCR rinden cerca de 1 millón de copias (2^{20}) del ADN analito.

Obtenido el ADN de la muestra que se desea analizar, cada ciclo consta de los siguientes pasos:

- Calentamiento a 95° C.
 - Permite que las dos hebras complementarias de ADN que sirven de molde se separen o se deshibriden.
 - Deshibridación inicial: es importante que el ADN de la muestra se separe completamente en la primera deshibridación, y debido a su longitud, es conveniente que la primera vez se mantengan los 95°C durante 5 minutos. Si al comienzo de la PCR el ADN se separa solo parcialmente, tiene tendencia a

rehibridarse en el paso posterior dificultándose, por lo tanto la reacción de cada hebra con los cebadores.

- Deshibridación durante los ciclos de PCR: Suficiente mantener esta temperatura durante unos 20 a 30 segundos.

➤ Enfriamiento a 37°C.

- A esta temperatura los cebadores se unen a las hebras complementarias de ADN flanqueando la secuencia que se desea amplificar. Para la mayoría de los propósitos, la temperatura de hibridación de los cebadores debe optimizarse empíricamente, ya que es el factor más crítico en cuanto a la especificidad de la reacción. Además es una temperatura de compromiso. Si la temperatura es demasiado alta la tendencia es a la deshibridación, pero si la misma existe, es muy específica a alta temperatura. Por otro lado, si la temperatura es demasiado baja existe hibridación inespecífica.

➤ Calentamiento a 72°C.

- Es la temperatura óptima de acción de la Taq ADN polimerasa para la elongación de los cebadores, mediante la incorporación específica de monómeros de desoxirribonucleótidos complementarios al extremo del cebador generándose, entonces, dos copias idénticas del ADN analito. En cuanto al tiempo que esta temperatura debe mantenerse, normalmente 20 segundos son suficientes para

hebras de longitud habitual. La Taq polimerasa puede adicionar 60 bases/seg. a 72° C.

➤ Cada ciclo puede repetirse tantas veces como ADN se quiere obtener, existiendo un número de ciclos óptimos para la reacción que son de 25 a 35 ciclos.

➤ Extensión final

- Por lo general luego del último ciclo, los tubos de reacción se mantienen a 72 ° C de 5 a 15 minutos, con el objeto de que se completen productos con extensiones parciales.

Los requerimientos de la reacción son muy simples.

- ADN muestra

Existe una serie de reglas sencillas para que el ADN molde no sea un problema en la reacción:

Integridad del ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de los que queremos amplificar.

Origen de la muestra y procesos de extracción: la muestra no debe llevar agentes quelantes como EDTA que reducen la concentración de iones Mg en la disolución. Tampoco debe haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes que inhibirán la actividad de la polimerasa.

Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN genómico de copia única se usan cantidades de 100 – 500 ng. En el caso de zonas repetidas se puede reducir esta cantidad a 10 - 50 ng. El mínimo oscila entre los 10 – 100 ng y el máximo entre 400 – 500 ng.

- Cebadores

Para la elección de los primers o cebadores, existen una serie de normas que nos pueden ayudar, aunque hay que indicar que también existen programas de ordenador que nos facilitan esta tarea (DNAsis, Primer 3, etc.).

El contenido G + C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas pirimidinas será 60%/40%. Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base. No seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria. Se recomienda que en los extremos las últimas bases sean G o C. Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de iniciadores; si esta existe entre los extremos 3' existe la posibilidad de que se formen dímeros de iniciadores. Deben tener un tamaño de 18 a 30 pb. La temperatura de hibridación de los cebadores debe ser similar en ambos y será variable en función a la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre los 45 y 60 °C.

- Desoxirribonucleótidos trifosfatos: dan la energía y el sustrato para la reacción.

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP, dTTP. Se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y 200 mM. Los dNTPs pueden captar magnesio, por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente. Se aconseja que la concentración de magnesio sea de 0,5 a 1 mM veces superior a la concentración de dNTPS.

- DNA polimerasa termo resistente

Existen diferentes tipos de ADN polimerasa que llevan a cabo la replicación del ADN, siguiendo el mismo método de síntesis se pueden clasificar en:

Termolábiles, temperatura optima de 37 – 42 °C. Se desnaturalizan con el calor.

Termoestables, temperatura optima de 74 °C, resiste durante 40 a 60 segundos a 96°C.

Inicialmente se uso el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E.coli* (Saiki y cols., 1985), la cual posee actividad 3'-----5' exonucleasa que le proporciona la capacidad de cambiar el nucleótido que ha sido erróneamente incorporado. La importancia de esta actividad radica en que, aumenta la fidelidad de la replicación del ADN original. Sin embargo se trata de una enzima termolábil, por lo que no soporta los ciclos y temperaturas utilizados en una PCR.

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa (Estivil, 1991). Es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. Esta enzima ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador). Pero esta enzima carece de la actividad 3'-----5' exonucleasa, lo que las hace menos seguras a la hora de comparar las fidelidades. Por ello se debe intentar conseguir las mejores condiciones para que esta aumente, como:

No usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de estos. Normalmente el número de ciclos utilizados es de 25 a 30.

La concentración de los dNTPs debe ser igual para los cuatro y debe ser la mas baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de ADN necesaria.

Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa. La concentración de magnesio en la reacción oscila entre 0,50 y 2, 5 mM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad de la PCR.

- Soluciona amortiguadora que contenga Mg: catión necesario para que la enzima funcione.

Por lo general esta formado por: 10 mM Tris-HCl (pH = 8,4 a temperatura ambiente), 50 mM KCl, 0,1% w/v gelatina y 1,5 mM MgCl₂.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la PCR. El DMSO añadido al buffer de la reacción en un 10 % contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN. También se pueden usar detergentes como el Tween 20, laureth 12 (0,1%) o Tritón x10, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilén glicol, glicerol, formamida, seroalbuminabovina (BSA), etc. aunque no son en ningún caso imprescindibles.

Tanto los cebadores como desoxirribonucleótidos trifosfatos se encuentran en exceso.

El equipamiento necesario para la reacción es un termociclador, que permite obtener las temperaturas deseadas rápidamente, de manera reproducible y precisa. La velocidad de calentamiento/enfriamiento de estos equipos es de 1 a 2 °C por segundo.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa podemos observarla en la siguiente figura.

3.7.1 Contaminación en la PCR.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado, aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña se amplifique y obtengamos un resultado que no sea real. Vemos que una de las mayores ventajas de la técnica, se convierte a la vez en el principal inconveniente. Existen una serie de normas que ayudan a evitar las contaminaciones. En caso trabajar con muestras de ARN las condiciones se deben extremar al máximo.

Lugar físico exclusivo para realizar la PCR. Uso de instrumental exclusivo para la PCR.

Utilización de reactivos y tubos estériles. Uso de guantes por el manipulador. Realización de controles de blanco (se añade agua en lugar de ADN, no debe existir amplificación).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

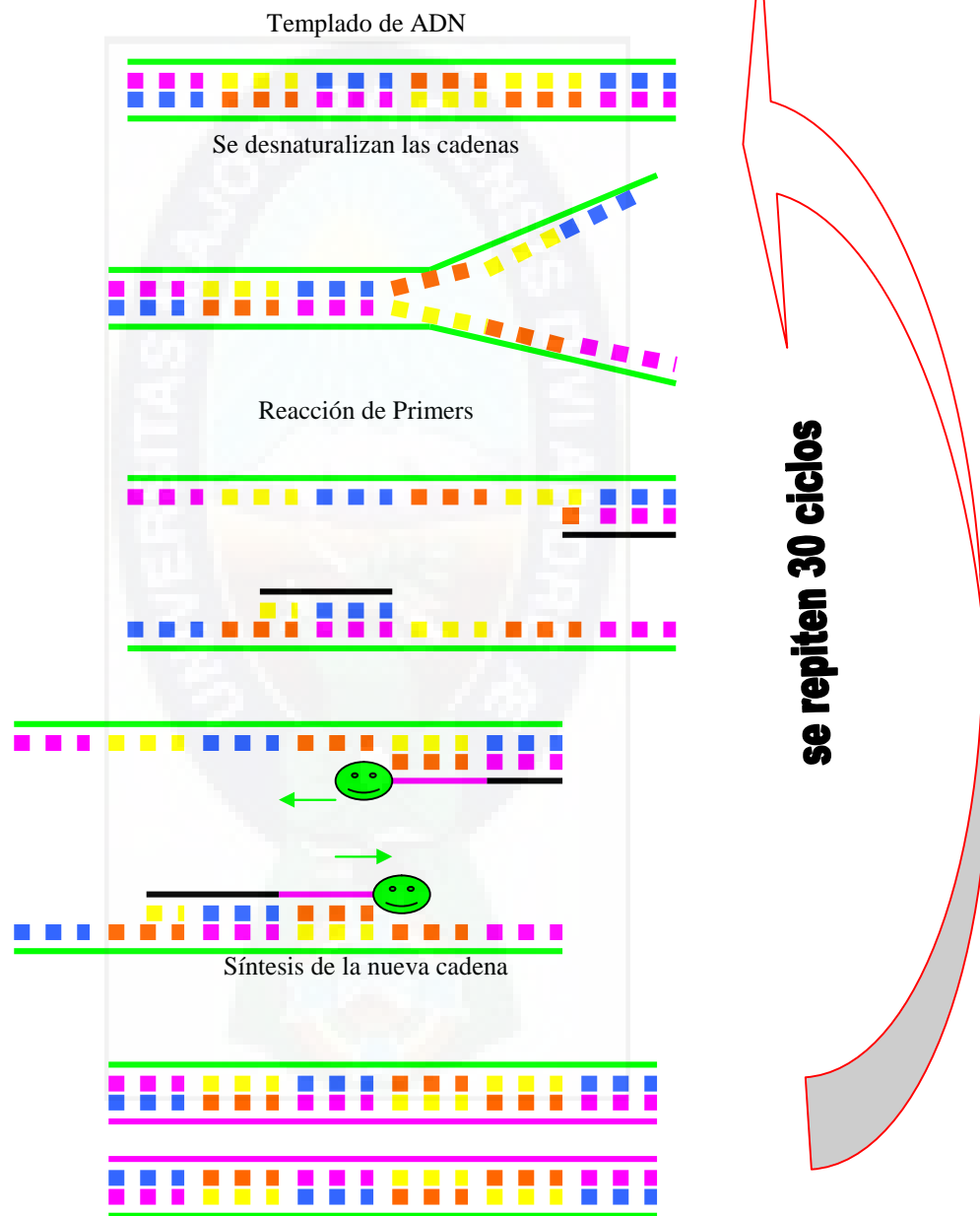


Figura 12. Reacción en Cadena de la Polimerasa

4. JUSTIFICACION

Debido al gran avance en la tecnología de investigación de ADN humano, se ha producido un cambio radical en el estudio de indicios criminalísticos.

Pero el éxito de la investigación depende en gran medida de las técnicas empleadas y así mismo de las técnicas que permitan la detección y el estudio previo de la muestra.

Por esta razón se han estado realizando numerosos estudios en cuanto se refiere al material mas adecuado que se debería utilizar para la recolección de muestras, de tal manera que también la muestra este garantizada en cuanto a su conservación, modo y medio de transporte; y dar por tanto una adecuada como rápida forma de extracción del ADN especialmente humano ya que esta siendo muy utilizado en la actualidad con fines de investigación forense y de paternidad.

Además de garantizar que la muestra recolectada este intacta y libre de contaminación.

Por este motivo se han encontrado numerosos soportes sobre los que se puede recolectar varios tipos de muestra como son: sangre, liquido seminal, saliva etc.

Estos soportes han sido fabricados con el objetivo de facilitar tanto el transporte como la extracción de pequeñas cantidades de ADN de la muestra.

El presente trabajo se plantea el siguiente problema, como establecer una comparación tanto en la recolección como en la extracción de ADN humano a partir de manchas de sangre sobre Papel Filtro Whatman N°3 y papeles especializados como el Papel FTA y el Papel Nucleico, sabiendo que se tendrá una mínima cantidad de muestra y por consiguiente se conseguirá también una mínima cantidad de material genético extraído.

De este modo se pretende obtener un soporte entre los tres que estudiaremos, que ofrezca a las muestras recolectadas: estabilidad en cuanto al tiempo desde su recolección hasta el momento de la extracción del ADN, que el método de extracción del material genético sea rápido y nos permita obtener una muestra libre de contaminación.

De igual manera se pondrán a prueba dos técnicas de revelado, las mismas que nos permitirán identificar las mínimas cantidades de ADN extraído en cada uno de los casos sobre los tres soportes estudiados.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Comparar tres tipos de soportes de papel para recolección de muestras con fines de analizar el ADN en la identificación de individuos y así realizar un aporte a la investigación Forense.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar una comparación en cuanto al tiempo de conservación de ADN en las muestras de sangre antes y después de la extracción del material genético, a partir de los tres soportes utilizados, Papel Filtro Whatman N°3, Papel FTA y Papel Nucleico.
2. Realizar una comparación y verificación de la presencia de ADN en las muestras recolectadas en los tres soportes de papel mediante Electroforesis en Gel de Agarosa.
3. Verificar la presencia de ADN humano mediante la amplificación por PCR del material genético extraído a partir de los tres soportes de papel, utilizando marcadores del Cromosoma Y.

4. Verificar la presencia de ADN humano amplificado perteneciente a las muestras recolectadas en los tres soportes de papel mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. RECOLECCION DE LA MUESTRA

Para realizar la recolección de la muestra, primero se desinfecto el dedo medio del paciente con la ayuda de un algodón con alcohol, luego con ayuda de una lanceta se realizo la punción capilar, desechando la primera gota de sangre, la segunda gota de sangre se recolecto sobre el soporte de papel formando una mancha de aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

Se dejo que las manchas de sangre recolectadas sequen durante unos 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, luego se identifica cada una de las muestras colocando el nombre del paciente, un numero o letra de identificacion y la fecha.

Las muestras fueron recolectadas de individuos varones para poder utilizar los marcadores del Cromosoma Y DYS 390 y DYS 392, durante la amplificación por PCR. Una vez recolectadas las muestras estas fueron conservadas en sobres de papel individuales a temperatura ambiente y en un ambiente seco hasta ser utilizadas.

6.2 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN PAPEL FILTRO WHATMAN N°3.

Una vez que se recolectaron las muestras se dejaron secar las manchas a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos y después de este tiempo se realizo la primera extracción del material genético a partir de muestras de sangre sobre Papel Filtro Whatman N°3.

Primero se obtuvo un fragmento del papel Whatman N°3 con ayuda de una hoja de bisturí nueva, teniendo el cuidado de recortar solo el lugar donde se encuentra la mancha de sangre, el corte de la muestra fue de aproximadamente 0,5 cm de diámetro.

El trozo de muestra obtenido se colocó dentro de un tubo eppendorf nuevo e identificado y luego se añadió al tubo con ayuda de una micropipeta 700 µl de solución TEC; esta solución está constituida por los siguientes reactivos: TRIS/ClH 1M, EDTA 0,5M, SDS 10% y ClNa 3M. Estos reactivos primero producen una digestión química mediante la rotura de la matriz extracelular y de las uniones intercelulares en presencia de detergentes iónicos como el dodecilsulfato de sodio o SDS. La eliminación de cationes divalentes en especial de calcio con agentes quelantes como EDTA, también desestabiliza la adhesión de células entre sí y con la matriz extracelular.

Luego se añadió 5 µl de proteinasa K 10 mg/7ml, produciendo de esta manera una digestión enzimática de tal forma que las proteínas de la matriz sean digeridas. Esta digestión requiere de largos tiempos de incubación, aproximadamente 12 horas a 56° C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a retirar el trozo de papel filtro, introduciendo un tip nuevo dentro del tubo eppendorf y luego retirándolo con cuidado de no dejar en el tubo ningún trozo de papel, quedando en el tubo una cantidad de líquido que luego se purificó para obtener posteriormente el material genético libre de contaminantes que produzcan la degradación del mismo.

El primer lavado para la purificación del ADN se realizó de la siguiente forma. Con la ayuda de una micropipeta se colocó 700 µl de fenol al tubo eppendorf del paso anterior, se mezcló primero por agitación cuidadosamente durante 5 minutos y luego se centrifugó a 1500 r.p.m. (revoluciones por minuto) durante 5 minutos. Después de este tiempo se obtuvo

tres fases que se distinguen con claridad en el tubo eppendorf. La primera fase en la parte superior del tubo es la fase acuosa donde se encuentran disueltos el ADN y ARN. La segunda fase que es la fase intermedia del tubo donde se encuentran las proteínas desnaturizadas por el fenol y se sitúan en la interfase. La tercera fase es la que se encuentra en el fondo del tubo, esta es la fase orgánica (inferior, más densa), donde quedan los lípidos de membrana. Se recolectó solo la fase acuosa, con ayuda de una micropipeta y un tip nuevo se colocó el volumen de toda esta fase en otro tubo eppendorf nuevo que lleva la misma identificación que el anterior. En este tubo se recolectó aproximadamente 400 μ l de fase acuosa la cual fue mezclada con 700 μ l de Cloroformo:alcohol isoamílico y se agitó cuidadosamente durante 5 minutos luego fue centrifugado a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. El alcohol isoamílico favorece en la separación nítida de las fases. Después de la centrifugación se retiró el tubo de la centrifugadora y se observó nuevamente tres fases. La primera fase como en el anterior caso era la fase acuosa (superior, menos densa) donde quedan disueltos el ADN y ARN. La segunda fase es donde se encuentran las proteínas desnaturizadas por el cloroformo y se sitúan en la interfase, la tercera fase es la fase orgánica (inferior, más densa), donde quedan los lípidos de membrana.

Se recolectó nuevamente 400 μ l de la fase acuosa con ayuda de una micropipeta y se colocó en otro tubo eppendorf nuevo y con la misma identificación que el anterior. En este nuevo tubo se procedió a realizar la precipitación del ADN para ello se colocó 40 μ l de NaCl 3M y dos volúmenes de etanol absoluto, todo fue mezclado con agitación suave durante 5 minutos.

De esta manera se realizó la purificación y precipitación del ADN. La sal NaCl 3M y el etanol absoluto alcohol orgánico son útiles en la purificación de pequeñas cantidades de

ADN. El NaCl 3M tiene la propiedad de cambiar la constante dieléctrica del agua haciendo que el ADN se separe de la fase acuosa y también en presencia del alcohol absoluto el ADN es insoluble.

Por último se dejó este tubo en reposo durante toda la noche y al día siguiente se eliminó todo el etanol colocando el tubo eppendorf dentro de un desecador. Después se resuspendió el ADN con un volumen de 30 µl de agua destilada estéril y fue conservado a -20 °C hasta su utilización.

Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras obtenidas y se identificaron de la siguiente manera. La primera muestra **W1d**, es del material genético extraído el mismo momento de la toma de muestra. La segunda muestra **W1s**, corresponde al material genético extraído una semana después de la toma de muestra. La tercera muestra **W2s**, pertenece a material genético extraído dos semanas después de la toma de muestra. Y la cuarta muestra **W3s**, corresponde al material genético extraído después de tres semanas de la toma de muestra. Las muestras fueron conservadas en sobres de papel a temperatura ambiente y en un lugar seco.

6.3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN PAPEL FTA ¹²

Para realizar la extracción de ADN a partir de papel FTA, primero se toma la muestra como se explicó anteriormente en el punto de Recolección de la Muestra.

Con ayuda de una hoja de bisturí nueva se cortó un pedazo del lugar donde se encuentra la mancha de sangre sobre el papel FTA, este pedazo debió tener aproximadamente 0,5 cm de diámetro aproximadamente.

¹² <http://www.whatman.com/products/?pageID=7.31.31> (2 of 3) 27/08/2004 15:12:27

Este trozo de muestra obtenido fue fragmentado en pequeños trozos que luego se colocaron dentro de un tubo eppendorf nuevo e identificado. Con la ayuda de una micropipeta se añadió al tubo 200 μl de la solución de purificación (FTA Purification Reagent) y se mezcló por agitación cuidadosamente durante 5 minutos.

Luego con mucho cuidado se retiró con la ayuda de una micropipeta los 200 μl de la solución de purificación que se encuentra en el tubo eppendorf teniendo en cuenta de no tocar los fragmentos de papel FTA.

Si los trozos de papel FTA se encuentran aun con rastros de sangre se realizan uno o dos lavados mas con el reactivo de purificación siguiendo los mismos pasos anteriormente mencionados, hasta que los trozos de papel FTA queden bien lavados y sin ningún rastro de sangre, el papel debe quedar completamente limpio.

La solución FTA Purification Reagent es una solución patentada que tiene la propiedad de quitar todas las impurezas que puedan contaminar al muestra de sangre o que pueden interferir durante la extracción del material genético.

Después se añadió con la ayuda de una micropipeta 200 μl de agua destilada estéril y se mezcló por agitación cuidadosamente durante 5 minutos, este lavado también puede ser repetido en caso de que sea requerido. Por último se retiró el agua destilada estéril con ayuda de una micropipeta y con cuidado de no tocar ningún trozo de papel FTA. Los trozos de papel FTA se quedaron dentro del tubo eppendorf y se dejaron secar en una estufa a 37°C, hasta que los pequeños trozos de papel FTA queden bien secos. En cada uno de los trozos de papel FTA ya se encuentra extraído el material genético y puede ser conservado dentro del mismo tubo a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

La tarjeta FTA actúa de la siguiente manera. Las tarjetas FTA están impregnadas con una fórmula química patentada que lisa las membranas celulares y desnaturaliza las proteínas. De esta forma los ácidos nucleicos son atrapados físicamente, siendo inmovilizados y estabilizados.

En el caso del papel FTA no puede realizarse un revelado de la muestra ya que esta se encuentra atrapada en el papel y para poder revelar el material genético, primero se debe realizar una amplificación por PCR, en el trabajo, dicha amplificación se realizó con los marcadores del Cromosoma Y DYS 390 y DYS 392.

En cuanto a la muestra solo utilizo una, muestra de sangre cuyo ADN fue extraído una semana después de la toma de muestra y este fue amplificado 30 días después de la extracción del ADN.

6.4 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN EN PAPEL NUCLEICO¹³

Se colocó una gota de sangre sobre el papel nucleico de la misma forma anteriormente ya descrita y una vez seca la muestra, con la ayuda de una hoja de bisturí nueva se cortó el pedazo de papel donde se encuentra la mancha de sangre, este trozo de papel debe ser de uno 0,5 cm de diámetro.

Este trozo de papel luego fue colocado dentro de un tubo eppendorf nuevo e identificado. Y con ayuda de una micropipeta se colocó al tubo 500 µl de agua destilada estéril, de tal manera que se produzca lisis de los glóbulos rojos que se encuentran en la muestra y en su eliminación de los contaminantes que puedan interferir en la extracción del material genético. Después con la ayuda de un tip nuevo se colocó el trozo de muestra en otro tubo

¹³ info@biodynamics.com.ar www.biodynamics.com.ar

nuevo igualmente identificado que el anterior y con la ayuda de una micropipeta se añadió 100 µl de agua destilada estéril, este nuevo tubo se colocó dentro de un recipiente con aceite, el aceite nos sirve para poder incubar a la muestra a una temperatura de 95°C durante 30 minutos, de esta manera se obtuvo la extracción del ADN.

El papel Nucleico de la misma forma que el papel FTA llevan dentro de su composición una serie de reactivos liofilizados que están patentados, estos reactivos se activan a una temperatura de 95°C permitiendo la extracción del material genético.

Luego de la incubación se saca el trozo de papel nucleico quedando el tubo eppendorf con el material genético. Las recomendaciones del producto nos aconsejan utilizar el material genético inmediatamente después de su extracción.

En el caso del papel nucleico se realizaron extracciones de ADN de las siguientes muestras. Primera muestra **N1d**, correspondiente al material genético extraído y revelado el mismo día de la extracción de ADN, no fue conservada. La segunda muestra **N1s**, corresponde a la extracción de ADN conservada durante una semana a -20 °C. La tercera muestra **N2s** corresponde a la extracción de ADN que fue conservada durante dos semanas a -20°C. Y la cuarta muestra corresponde a la extracción de ADN que fue conservada durante tres semanas a -20°C.

6.5.AMPLIFICACION POR PCR

Componentes de la reacción de PCR¹⁴

TABLA 4

Protocolo de preparación del Mastermix para PCR

	DYS 390	DYS392
--	----------------	---------------

¹⁴ Ma Luisa Cal Teba: Polimorfismos de DNA microsatélite de Cromosoma Y.

ADN	1 – 20 ng	1 -20 ng
Primers	0,2 Um	0,2 Um
dNTPs	0,2 Mm	0,2 Mm
Buffer 10X	1 X	1 X
Cl₂Mg	1,5 Mm	1,5 Mm
Taq DNA polimerasa	0,65 U	0,65 U
H₂O	Hasta 25 Ul	Hasta 25 Ul

Para realizar la amplificación por PCR, primero se realizaron los cálculos correspondientes para poder realizar el protocolo de preparación del mastermix que se muestra en la tabla 4.

Se debe tomar en cuenta que los cebadores utilizados pertenecen a los marcadores del Cromosoma Y, DYS390 y DYS 392.

Después de realizados los cálculos se procedió a elegir las muestras que se amplificarían. Primero se escogió el material genético extraído a partir de las muestras de sangre sobre papel filtro Whatman N°3. Las muestras escogidas pertenecían a la extracción que fue realizada el mismo día de la toma de muestra **W1d**, y la otra muestra pertenecía a la extracción realizada después de una semana de la toma de muestra y que se identifica como **W1s**.

Luego se escogió el material genético que fue extraído de las muestras recolectadas sobre papel nucleico, también fueron escogidas dos muestras y una de ellas pertenecía a la muestra cuya extracción de ADN había sido realizada el mismo día de la amplificación por PCR identificada como **N1d**, la otra muestra corresponde a la extracción de ADN conservado por una semana a -20°C identificada como **N1s**.

Finalmente se escogieron dos pequeños trozos de papel FTA que ya contaban con el material genético extraído y que habían permanecido conservados a temperatura ambiente dentro de un eppendorf durante 30 días. Estas fueron identificadas para la amplificación por PCR como **FTA390** y **FTA 392** respectivamente.

Una vez escogidas las muestras para ser amplificadas, se procedió a la preparación del cuarto blanco irradiando con luz UV todos los materiales que fueron utilizados para la preparación del mastermix. Después de este tiempo se entra al cuarto blanco y se prepara con mucho cuidado el mastermix teniendo cuidado de mantenerlo siempre en refrigeración. Al concluir con la preparación del mastermix se sale del cuarto blanco y se ingresa al cuarto azul donde se encuentran las muestras elegidas anteriormente, estas muestras siguen el siguiente orden W1s 390, N1s 390, FTA 390, W1s 392, N1s 392, FTA 392 . a cada uno de los tubos se colocó 2 µl de muestra con excepción de los tubos que contenían el papel FTA a estos tubos se colocó el papel FTA y luego se completó el volumen con 2 µl de agua destilada estéril.

Después de colocadas las muestras en cada uno de los tubos PCR se ingresó al cuarto gris donde se introducen los tubos dentro de un termociclador para producir la amplificación por PCR.

6.6 ELECTROFORESIS

6.6.1 Electroforesis en gel de Agarosa

Para la preparación del gel de agarosa se colocó en un Matraz Erlenmeyer 25 ml de tampón TBE 1X y a continuación se añadió 0,25 g de agarosa para preparar un gel a una

concentración del 1%. Se calentó esta solución en un horno microondas durante dos minutos.

Después de sacar la solución del microondas se deja enfriar durante un tiempo corto y se añaden 3 μl de bromuro de etidio, luego se vierte toda esta solución en un molde debidamente preparado con su correspondiente peine que delimitara los pozos donde serán sembradas las muestras. Se deja gelificar a temperatura ambiente durante 40 a 45 minutos. Luego se preparo la cámara de electroforesis horizontal, llenándola primero con el tampón TBE1X.

Una vez gelificada la agarosa se procede a sacar el peine para luego introducir el gel dentro de la cámara de electroforesis. Continuación se prepararon las muestras para ser sembradas en el gel de agarosa, mezclando 5 μl de muestra con 2 μl de azul de bromofenol como se puede observar en la figura 13.

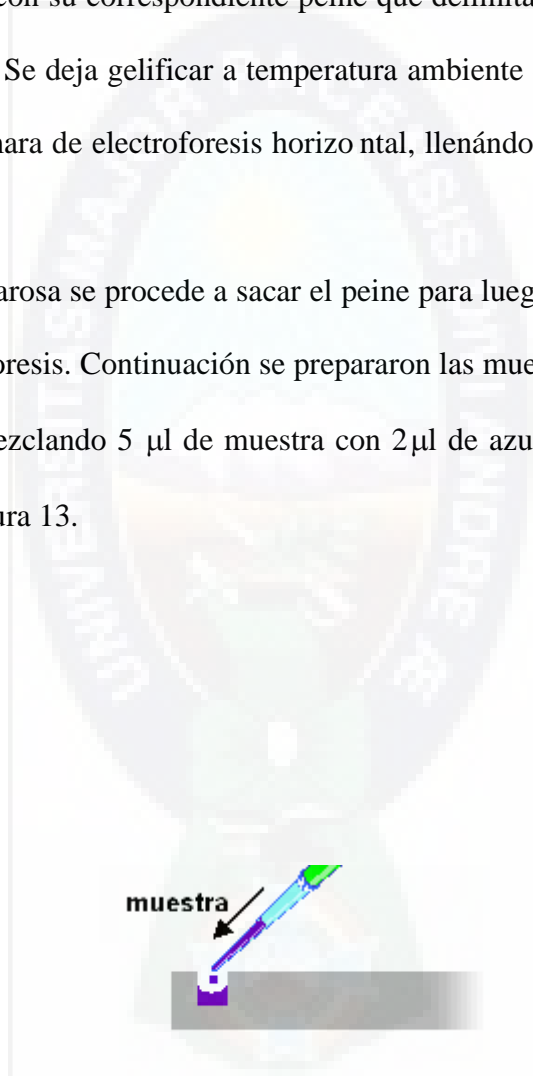


Figura 13. Sembrado de una muestra en el gel

Las muestras que fueron sembradas pertenecían solo al material genético que fue extraído de los soportes de papel filtro Whatman N°3 y papel Nucleico ya que la electroforesis en gel de agarosa se realizó con el fin de comprobar la presencia o ausencia de ADN.

Primero se sembraron las muestras correspondientes al papel Filtro Whatman N° 3, en el primer pozo del gel se sembró la muestra **W1d** correspondiente a la extracción del material genético realizada el mismo día de la toma de muestra, en el segundo pozo del gel se sembró la muestra **W1s** correspondiente al material genético extraído a partir del papel filtro Whatman después de una semana de la recolección de la muestra. El tercer pozo fue sembrado con la muestra **W2s** que representa al ADN extraído después de dos semanas de la toma de muestra. Y por último en el cuarto pozo se sembró la muestra **W3s** perteneciente al ADN extraído a partir de la muestra sobre papel filtro que fue guardada durante tres semanas.

Luego se sembraron las muestras obtenidas a partir de las manchas de sangre sobre papel Nucleico, el quinto pozo del gel fue sembrado con la muestra **Nd** que representa al ADN extraído el mismo día de la toma de muestra y que fue revelado en ese mismo momento por electroforesis en gel de agarosa. El sexto pozo fue sembrado con la muestra **N1s** correspondiente al material genético extraído a partir de la mancha de sangre sobre papel nucleico y que fue conservada por una semana a una temperatura de -20°C . El séptimo pozo del gel se sembró con la muestra **N2s** correspondiente al ADN presente en la muestra sobre papel Nucleico, siendo este material genético conservado desde el momento de su extracción por dos semanas a -20°C . Y el último pozo fue sembrado con la muestra **N3s** que corresponde al material genético conservado durante tres semanas después de su extracción a una temperatura de -20°C .

Después de sembrar todas las muestras se cerro la cámara de electroforesis y se programo a 150 voltios por un tiempo de 30 minutos. Transcurrido este tiempo de apago al fuente de poder y se destapo la cámara de electroforesis, luego se retiro el gel teniendo el cuidado de manipular todo siempre con guantes. El gel fue colocado en un transiluminador de luz UV para poder observar la fluorescencia emitida por las bandas de ADN obtenidas.

6.6.2 Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Se preparo el gel de poliacrilamida tomando todas las medidas de seguridad en laboratorio ya que este reactivo es altamente neurotóxico.

Primero se prepararon los reactivos necesarios para la preparación del gel de poliacrilamida. Se preparo la solución acrilamida - bisacrilamida en una concentración del 40%, siguiendo una proporción de 38:2, se mezclaron 38 gramos de Acrilamida con 2 gramos de bisacrilamida para disolverlos en 100 ml de agua destilada estéril.

Luego se preparo el tampón TBE 10X y los reactivos PSA y TEMED que actúan como activadores de la polimerización.

Luego se prepararon los vidrios que sirvieron de molde para el gel, estos vidrios fueron lavados y muy bien desengrasados antes de ser utilizados. Al vidrio largo que es donde se pegara el gel se coloca una solución compuesta por 500 μ l de ácido acético al 5%, 500 μ l de etanol al 70 % y 3 μ l de Bincilan, se esparce esta preparación sobre toda la superficie del vidrio para permitir que el gel de poliacrilamida quede pegado al vidrio largo.

Al vidrio mas corto se le coloca Gel Repel que es un reactivo ya preparado en paños toallas con las que se esparce por toda la superficie del vidrio corto con la finalidad de evitar que

el vidrio se pegue al gel de poliacrilamida. También en lugar del Gel Repel se puede utilizar silicona líquida ya que cumple la misma función.

Al tener preparados ambos vidrios se procedió con el armado de los mismos colocando unos espaciadores entre ellos y luego se realizó la preparación del gel. Para la preparación del gel se disolvieron 44,7 gramos de urea en 57,3 ml de agua destilada estéril con ayuda del calor sin dejar que la solución hierva. Cuando la urea queda disuelta se deja enfriar y luego se añade 14 ml de Acrilamida al 40% y 5,6 ml de tampón TBE 10X, luego se añaden los activadores de la polimerización 750 μ l de PSA y 75 μ l de TEMED y de inmediato se vierte todo el preparado sobre el vidrio largo para luego tapar sobre este con el vidrio corto, luego se colocan las pinzas para sujetar los dos vidrios y por último se coloca el peine. Se espera la polimerización por 2 horas aproximadamente.

En este tiempo se realiza la preparación de las muestras tomando 2,5 μ l de muestra que es el amplificado y mezclando con 2,5 μ l de azul de bromofenol. En este gel se sembraron las muestras que fueron amplificadas por PCR para verificar la presencia de ADN humano.

Una vez polimerizado el gel se realiza el armado de la cámara de electroforesis, primero los vidrios con el gel se colocan de forma vertical apoyando a la cámara y sujetándola a la misma con unas pinzas. Luego se va llenando la cámara de electroforesis con tampón TBE 0,5 X, después se retira el peine y se lavan los pozos de sembrado del gel con el mismo tampón.

Después de haber armado la cámara de electroforesis vertical con el gel de poliacrilamida se enciende la fuente de poder y se programa el voltaje, 1500 voltios y se calienta el gel por 15 minutos. Después de este tiempo se desconecta la cámara de electroforesis y se

realiza el sembrado de cada una de las muestras que fueron amplificadas con los marcadores DYS 390 y DYS 392 del Cromosoma Y.

Primero se sembró con la ayuda de una micropipeta la escalera E 390 que representa a los alelos presentes en dicho marcador. En el segundo pozo se sembró el amplificado perteneciente a la muestra W1d 390, en el tercer pozo se sembró el amplificado correspondiente a la muestra N1d 390 y el cuarto pozo correspondía al amplificado FTA 390. Luego se sembró el quinto pozo con la escalera DYS392, el sexto pozo del gel fue sembrado con el amplificado DYS 392 de la muestra W1s 392, el séptimo pozo fue sembrado con el amplificado perteneciente a la muestra N1s 392 y por último el octavo pozo fue sembrado con el amplificado de la muestra FTA392.

Una vez sembradas todas las muestras se cerró la cámara de electroforesis vertical y se encendió la fuente de poder programando a 1500 voltios durante un tiempo de 60 minutos.

Una vez concluida la corrida electroforética se desmontó el gel de la cámara de electroforesis vertical y con mucho cuidado se desprendió el vidrio corto quedando el gel adherido al vidrio largo y con este se realizó el revelado con Nitrato de Plata.

El gel luego se colocó dentro de una cubeta que contenía la solución fijadora que tiene como finalidad fijar las bandas de ADN que fueron obtenidas en el gel. Esta solución está constituida por 10 ml de ácido acético glacial, 100ml de etanol absoluto y la cantidad suficiente de agua destilada para 1000 ml. El gel debe permanecer dentro de esta solución durante 40 minutos en movimiento y en la oscuridad. Concluido este tiempo se retiró el gel de la primera cubeta y se lo llevó a la segunda cubeta que contiene la solución de nitrato de plata, el gel también se mantuvo en esta cubeta durante 40 minutos en agitación y oscuridad. Por último se colocó el gel en la solución reveladora constituida por hidróxido de sodio al 3 % más 3 ml de formaldehído, esta solución tiene la función de oxidar el

nitrate de plata produciendo de esta forma una coloración café oscura que representa a las bandas de ADN en un fondo amarillo. El gel se sacó de la segunda cubeta y se introdujo en esta tercera cubeta con la solución reveladora y se mantuvo aquí durante 30 minutos en agitación y oscuridad. Después de este tiempo se pudo observar el gel de una coloración amarilla con las bandas de ADN representadas de color café que pueden reconocerse con claridad.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Resultado de la Extracción de ADN.

En cuanto a los métodos de extracción de ADN que fueron utilizados en el trabajo se pueden citar varias diferencias sobre todo en lo que se refiere al procedimiento y tiempo empleados en cada uno de los casos.

Con referencia al primer caso, extracción de ADN a partir de manchas de sangre sobre papel Whatman N°3, podemos mencionar que en cuanto al tiempo, durante todo el procedimiento desde el inicio con la toma de muestra hasta la obtención del material genético se tarda aproximadamente dos a tres días. Y en lo que se refiere al procedimiento de extracción el utilizado en este caso es más largo ya que se deben preparar todos los reactivos necesarios, se utilizan más equipos y en sí el protocolo es más largo de realizar.

El método de extracción de ADN utilizado para las muestras recolectadas sobre papel Nucleico en cuanto al tiempo empleado requiere como máximo un día desde la toma de muestra hasta la extracción de material genético. Además los reactivos utilizados son pocos. Con referencia al procedimiento de extracción en este papel, ya que es un papel especialmente diseñado para el análisis del ADN entonces el procedimiento es corto y rápido y fácil de realizarse.

Con referencia al método de extracción de ADN en el caso de manchas de sangre sobre papel FTA, en cuanto al tiempo empleado este es mas rápido. Los reactivos utilizados en el procedimiento son pocos y ya vienen preparados y son de fácil manipulación.

7.2. Resultado de la Electroforesis en Agarosa.

En la fotografía que sigue a continuación se observa el revelado con bromuro de etidio después de haber realizado una electroforesis en gel de agarosa.

Como se menciona en los objetivos, esta electroforesis se realizo con la finalidad de verificar la presencia de material genético obtenido a partir de manchas de sangre sobre papel filtro Whatman N°3 y Papel Nucleico.

1 2 3 4 5 6 7 8



Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa del material genético extraído a partir de muestras de sangre sobre papel Filtro Whatman N°3 y Papel Nucleico. Revelado de las muestras con bromuro de etidio visto a través de un transiluminador de luz UV.

1. **W1d** ADN extraído el mismo día de la toma de muestra sobre papel filtro Whatman N°3.
2. **W1s** ADN extraído después de una semana de la toma de muestra sobre papel Whatman N°3
3. **W2s** ADN extraído después de dos semanas de la toma de muestra sobre papel filtro Whatman N°3.
4. **W3s** ADN extraído después de tres semanas de la toma de muestra sobre papel Whatman N°3.
5. **N1d** ADN extraído el mismo día de la toma de muestra sobre papel Nucleico.

6. **N1s** ADN extraído a partir de papel Nucleico y conservado una semana a -20°C .
7. **N2s** ADN extraído a partir de papel Nucleico y conservado durante dos semanas a 20°C .
8. **N3s** ADN extraído a partir de papel Nucleico y conservado durante tres semanas a 20°C .

En la fotografía se observan los resultados obtenidos a través de la electroforesis en gel de agarosa y en general se evidencia la presencia de ADN en todas las extracciones realizadas para ambos soportes.

La diferencia en la intensidad de fluorescencia obtenida en cada una de las bandas puede deberse a la cantidad de ADN obtenida en cada extracción y tomando en cuenta este aspecto podemos mencionar que la primera banda observada perteneciente al pozo 1 con la muestra **W1d** tendría la mayor cantidad de ADN debido a la intensidad de fluorescencia observada, si comparamos con las otras tres bandas pertenecientes al ADN obtenido de las otras muestras sobre papel Whatman N°3.

Las dos bandas siguientes pertenecientes a pozo 2 muestra **W1s** y pozo 3 muestra **W2s** presentan una intensidad de fluorescencia menor a la anterior, son menos claras y por lo tanto se habrá obtenido una cantidad menor de ADN, este aspecto puede deberse a el tiempo que se tardo entre la toma de muestra y la extracción del material genético que fue de una semana y dos semanas.

Por ultimo la banda observada en el pozo 4 muestra **W3s** presenta una intensidad mínima, la banda de ADN no es clara, esto como ya se menciono anteriormente representa que se obtuvo una cantidad mínima de ADN y al igual que en los anteriores casos podía deberse al tiempo que transcurrió entre la toma de muestra y la extracción del material genético.

Pero la cantidad de ADN obtenida en cada uno de los casos anteriormente mencionados no solo puede deberse al tiempo transcurrido entre la toma de muestra y el momento de la extracción, sino también a la forma de manipulación tanto de los reactivos como de la muestra durante el procedimiento de extracción del material genético.

En cuanto a las extracciones de ADN obtenidas a partir de las manchas de sangre sobre papel nucleico, estas están claramente representadas y evidenciadas mediante la fotografía, observadores en todos los casos la presencia de ADN.

En el caso del papel Nucleico las bandas de los pozos 5 y 6 pertenecientes a las muestras **N1d** y **N1s** respectivamente presentan intensa fluorescencia lo que demuestra que existe mayor cantidad de ADN en estas muestras, este aspecto puede deberse al tiempo de conservación de las muestras después de su extracción.

Para la muestra **N1d** se extrajo el ADN y se revelo en ese momento y en la muestra **N1s** se extrajo el ADN y se conservo durante una semana -20°C , antes de ser revelada.

Para el caso de los pozos 7 y 8 correspondientes a las muestras **N2s** y **N3s** respectivamente, las fluorescencias de las bandas de ADN son menos intensas.

Representan que existe ADN pero en poca cantidad. Este aspecto también puede deberse al tiempo de conservación del ADN, para la muestra **N2s** dos semanas de conservación a -20°C y para la muestra **N3s** tres semanas de conservación a -20°C .

De igual forma como en el anterior caso no puede ser un aspecto determinante el tiempo de conservación de la muestra para obtener una cantidad mayor o menor de ADN, también pueden influir otros aspectos como la forma de manipulación de las muestras durante la extracción del ADN. Y en el caso del papel nucleico puede

interferir el proceso de extracción del ADN ya que el método de purificación no es muy confiable.

En el caso del papel Nucleico no se tomo en cuenta el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y el momento de extracción del material genético como en el caso del papel Whatman N°3 ya que el papel Nucleico es un papel especialmente diseñado para la conservación de las muestras, la dificultad se presenta una vez extraída la muestra, por ello se verifico a presencia de ADN según el tiempo de conservación después de su extracción.

7.3 Resultados de la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Los resultados obtenidos a través del gel de poliacrilamida se observan en la siguiente fotografía Figura 16.

Mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida se demuestra la presencia de ADN humano ya que se utilizaron las amplificaciones por PCR de algunas muestras del papel Filtro Whatman N°3, Papel Nucleico y Papel FTA para los marcadores DYS 390 y DYS 392 del Cromosoma Y

DYS 390

DYS 392

E 390 1 2 3

E392 4 5 6

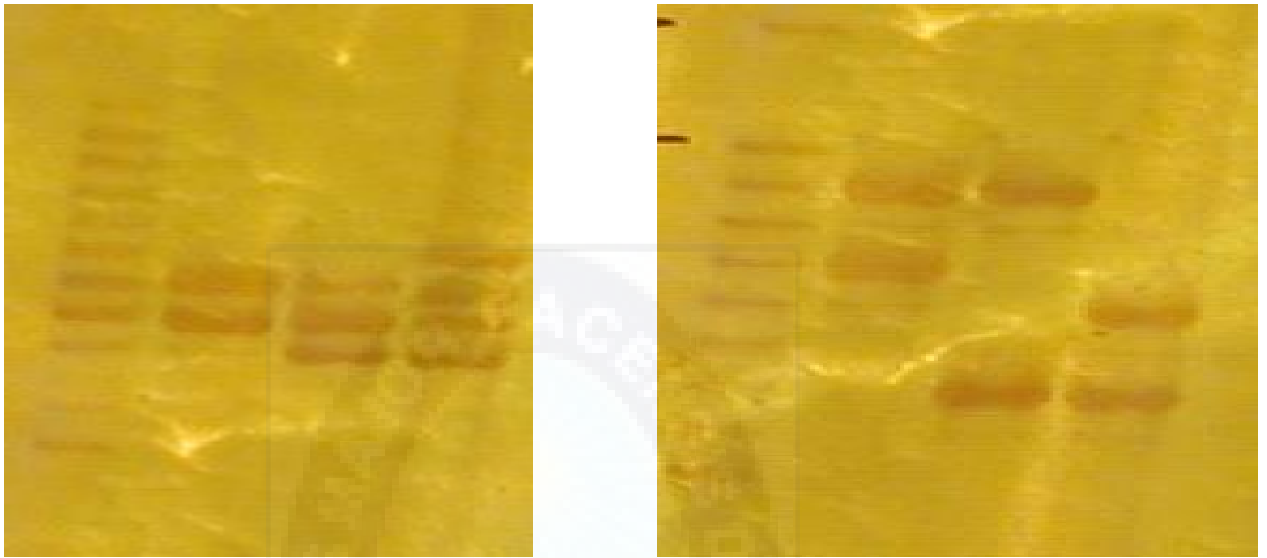


Figura 15. Revelado de las muestras amplificadas por PCR en gel de poliacrilamida obtenidas a partir de las manchas de sangre sobre papel filtro Whatman N°3, papel Nucleico y papel FTA. Tinción nitrato de plata.

DYS 390. Marcador del Cromosoma Y

DYS 392. Marcador del Cromosoma Y

E 390 Escalera 390 con alelos 22,23,24,25 y 26

E 392 Escalera 392 con alelos 11, 12, 13, 14 y 16

1. Amplificado DYS 390 de la muestra **W1d**.
2. Amplificado DYS 390 de la muestra **N1d**
3. Amplificado DYS 390 de la muestra **FTA**
4. Amplificado DYS 392 de la muestra **W1d**
5. Amplificado DYS 392 de la muestra **N1d**
6. Amplificado DYS 392 de la muestra **FTA**

En la primera fotografía se observan los resultados obtenidos para el marcador DYS 390. Se observa primero la escalera DYS 390 que está representada por varias bandas dispuestas a modo de escalera y cada una de estas bandas corresponde a un alelo, los alelos del marcador DYS 390 son alelo 22, 23, 24, 25 y 26 como se puede observar en la fotografía. La posición en la que se encuentran estos alelos se utilizan para determinar el o los alelos presentes en cada una de las muestras amplificadas para este marcador.

En la posición 1 se encuentra la amplificación para el marcador DYS 390 de la muestra **W1d** en esta muestra se pueden observar dos bandas, una que se encuentra en el mismo lugar que el alelo 25 y la otra se encuentra en la misma posición del alelo 26. En la posición 2 se encuentra la amplificación para el marcador DYS 390 de la muestra **N1d**, de igual forma se observan dos bandas dispuestas en las mismas posiciones de los alelos 25 y 26. En la posición 3 se encuentra la amplificación para el marcador DYS 390 de la muestra FTA y presenta también dos bandas en la posición de los alelos 25 y 26.

En la segunda fotografía se encuentran representados los resultados para el marcador DYS 392. Las primeras bandas observadas son de la escalera E 392 y cada una de estas bandas al igual que en el anterior caso representan un alelo del marcador DYS 392 estos alelos pueden ser el 11, 12, 13, 14 y 16. En la posición 4 se observan las bandas correspondientes a la amplificación DYS 392 para la muestra **W1s** ubicadas en los alelos 12 y 14. En la posición 5 se observan las bandas de la amplificación DYS 392 para la muestra **N1s**, solo se distingue una banda en la posición del alelo 12. Y en la posición 6 se encuentran las bandas de la amplificación DYS 392 para la muestra FTA una de las banda se encuentra en la posición del alelo 14.

En todos los casos citados se observa la presencia de bandas lo que evidencia ADN humano amplificado para los marcadores DYS 390 y DYS 392. Además se demuestra que el ADN extraído y amplificado a partir de las manchas de sangre en los tres soportes tiene ADN humano que puede ser identificado y utilizado para fines de investigación forense y en este caso para la investigación de líneas paternas.

8. CONCLUSIONES.

1. Se llego a comparar de una manera general los tres soportes utilizados y se llego a la conclusión que para la recolección de muestra los tres soportes de papel son muy efectivos y favorables así como para la conservación y transporte de las mismas.

Con referencia al los protocolos de extracción en el caso del papel filtro Whatman N°3 el protocolo es un poco largo a diferencia de los protocolos del papel FTA, y del papel Nucleico que son mas sencillos y mas rápidos, por lo tanto estos dos últimos soportes son mas eficientes en cuanto tiempo que tarda la extracción del ADN a partir de la muestra.

En conclusión los tres soportes pueden ser utilizados para recolectar muestras con fines de identificación en casos del ámbito forense o de paternidad, pero el más recomendable es el papel FTA por todas las cualidades que se pudieron observar a lo largo del trabajo.

2. El tiempo de conservación de ADN humano en la muestra fue determinado en los tres soportes, realizando las correspondientes extracciones de ADN a diferentes tiempos. De esta manera llegamos a la conclusión de que el material genético obtenido a partir del papel filtro Whatman N°3 es de buena calidad como se pudo observar en el gel de agarosa y pudimos comprobar que la muestra de sangre conservada por varias semanas mantiene el material genético integro y en una cantidad considerable y altamente aceptable para poder realizar cualquier tipo de estudios de tipo forense o de paternidad.

Las muestras de sangre recolectadas sobre papel FTA como ya se indica en sus propiedades puede mantener el material genético integro en la muestra. Lo que realizamos fue la extracción del material genético y lo conservamos durante un mes aproximadamente y obtuvimos ADN humano como se ve reflejada en la fotografía

del gel de Poliacrilamida. Por lo tanto concluimos que el papel FTA es un soporte excelente tanto para la conservación del material genético en la muestra misma como para la conservación del material genético ya extraído.

Con referencia la papel Nucleico es también un soporte adecuado para la recolección de muestras como en este caso muestras de sangre pero tiene la dificultad de que con el transcurso del tiempo el material genético extraído de este soporte se va degradando, esto sucede cuando el material genético ya extraído del papel es conservado por mucho tiempo.

3. Por la técnica de electroforesis en Agarosa se pudo determinar la presencia de ADN humano extraída de cada una de las muestras que estaban sobre los soportes de papel utilizados. En cuanto al ADN humano extraído a partir del papel filtro Whatman N°3 en todo los casos se obtuvieron buenos resultados como se puede observar en la fotografía del gel de agarosa que se encuentra en resultados.

Con respecto al material genético que fue extraído a partir de las muestras sobre papel Nucleico, fueron reveladas también en gel de Agarosa y se pudo verificar la presencia de ADN humano.

Al realizar la comparación mediante la electroforesis en gel de agarosa de el material genético extraído de ambos soportes, podemos concluir que se obtuvieron en ambos casos material genético de buena calidad, integro y libre de degradación con excepción del último caso donde el material genético se degrado un poco por ser conservado por un largo periodo de tiempo después de haberse extraído el mismo a partir del papel Nucleico.

Para el caso de las muestras sobre papel FTA, el material genético extraído se encuentra atrapado en el mismo soporte por lo cual no puede ser revelado

directamente mediante la electroforesis en gel de Agarosa; previamente debe ser amplificada la muestra por PCR.

4. Se realizo la amplificación del material genético extraído de los tres soportes: de papel filtro Whatman N°3, papel FTA y papel Nucleico. Las amplificaciones se realizaron por PCR y para tal efecto como ya se describió en métodos y resultados, se utilizaron dos marcadores del *Cromosoma Y* como son el DYS 390 y DYS 392. Mediante esta amplificación se llego ala conclusión de que el material genético obtenido si pudo ser amplificado, no fue inhibido y en todos los casos se obtuvieron las respectivas bandas de ADN humano que pueden ser claramente identificadas el la fotografía del gel de Poliacrilamida. También mediante esta amplificación se pudo llegar a determinar la eficacia del papel FTA para poder conservar el ADN después de su extracción.
5. Mediante la electroforesis en gel de Poliacrilamida y su correspondiente rev elado con tinción de Nitrato de Plata se llego a realizar una comparación cualitativa por simple observación del ADN humano obtenido de cada una de las muestras. En cada uno de los casos se analizaron de manera cualitativa las bandas de ADN que se pueden observar en la fotografía del gel de Poliacrilamida y se determino que el material genético obtenido a partir de papel filtro Whatman N°3, papel Nucleico y papel FTA es de muy buena calidad, tanto en la extracción como en la amplificación y puede ser muy bien utilizado para fines de análisis en casos criminalísticos o de paternidad.

9. BIBLIOGRAFIA

- Luque, José. BILOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA. Ed Harcourt. Madrid – España.2001
- Cox, Timothy. BIOLOGIA MOLECULAR EN MEDICINA. Ed Panamericana. Madrid – España. 1998
- LA HUELLA DEL ADN EN LA INVESTIGACIÓN FORENSE. L. Borjas, S Rebollo, S. Gomez, D Corach. Pp 120 – 130.
- www.whatman.com/products/?pageID=7.3127/08/2004 15:10:57.
- http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/13_PAGE.PDF.
- INVESTIGACION E IMPLEMENTACION DE SISTEMAS DE IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS POR TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR, CON ESPECIAL REFERENCIA A LOS ESTUDIOS **POST-MORTEM**. **Autor:** Dr. Gustavo Adolfo Penacino. **Director:** Dr. Daniel Corach. UBA Buenosaires-Argentina
- Maria Luisa Cal Teba. POLIMORFISMO DE ADN MICROSATELITE DE CROMOSOMA Y. ESTUDIO DE LA POBLACION DE GALICIA Y APLICACIONES FORENCES.
- www.biodynamics.com.ar
- <http://www.whatman.com/products/?pageID=7.31.31> (2 of 3)27/08/2004 15:12:27
- Venancio, G: 12 Marcadores del Cromosoma Masculino en la Investigación Criminal



PREPARACION Y ACCION DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS

MATERIALES:

Materiales de Recolección de Muestra

- Algodón
- Alcohol yodado
- Lanceta estéril
- Guantes Desechables
- Barbijo

Materiales Extracción de ADN

- Papel filtro Whatman N°3, Papel FTA, Papel Nucleico
- Sacabocados de papel
- Ependorff
- Gradillas para ependorff
- Micropipeta
- Tips azules
- Tips amarillos
- Parafilm
- Microcentrifugadora
- Incubadora
- Hornilla
- Termociclador
- Transiluminador
- Cámara de electroforesis vertical
- Cámara de electroforesis horizontal

REACTIVOS

PROTOCOLO DE EXTRACCION EN PAPEL FILTRO

- Solución TEC
- Proteinasa K
- SDS
- Fenol
- Cloroformo/ alcohol isoamilico
- CNa 3 M
- Etanol absoluto

PROTOCOLO DE EXTRACCION ENPAPEL NUCLEICO ¹⁵

- Aceite
- Agua estéril

PROTOCOLO PARA EXTRACCION EN PAPEL FTA ¹⁶

- Solución de purificación (FTA Purification Reagent).
- Agua estéril

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- Agarosa 1%
- Tampón TBE 1X

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

- Poliacrilamida 40%
- Urea
- TEMED
- PSA
- TBE 10X
- Agua destilada
- Tampón TBE 0,5X

PROTOCOLO DE EXTRACCION EN PAPEL FILTRO

- TEC

Mezclar 100 ml de T10E10 con 3,3 ml de ClNa 3M

T10 E10: Mezclar 1ml de TRIS/ClH 1M pH: 7,5 con 2 ml de EDTA 0,5 M pH: 8.

Llevar 100 ml con agua destilada.

TRIS/ClH 1M pH: 7,5

¹⁵ info@biodynamics.com.ar www.biodynamics.com.ar
v10/04

¹⁶ <http://www.whatman.com/products/?pageID=7.31.31> (2 of 3)27/08/2004 15:12:27

Disolver 121,1 gramos de tris base en 800 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7,5 por agregado de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a un volumen final de 1000 ml.

EDTA 0,5 M pH: 8

Disolver 186,1 gramos de EDTA disódico en 800 ml de agua destilada. Agregar lentejas de hidróxido de sodio hasta pH: 8, con agitación constante. Llevar a un volumen final de 1000 ml.

ClNa 3M.

Disolver 174,9 grs. de cloruro de sodio en agua destilada. Llevar a un volumen final de 1000 ml

- **Proteinasa K**

Disolver 100 mg de proteinasa K liofilizada en 5 ml de agua destilada estéril.

ACCION: Destruye las membranas nucleares, digiere proteínas, principalmente histonas que de otra forma permanecerían fuertemente ligadas al DNA dificultando su extracción.

- **SDS 10%**

Disolver 100 grs. de dodecil sulfato de sodio en 900 ml de agua caliente. Ajustar a pH 7,2 por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a un volumen final de 1000 ml.

ACCION: Solubiliza los componentes celulares

- **Fenol.**

Fundir a baño maría el fenol sólido y llenar hasta la mitad de un frasco color caramelo con el líquido resultante. Agregar un volumen de TRIS/ClH 1M pH: 7,5, 0,2 % de 2-hidroxiquinolina. Agitar bien hasta que se forme una emulsión, decantar

hasta observar las dos fases y descartar la parte acuosa. Agregar nuevamente TRIS/ClH 1M pH: 7,5 y repetir el proceso varias veces, hasta que la fase acuosa conserve su pH original de 7,5. Conservar en solución de TRIS/ClH 0,1M.

ACCION: El fenol interacciona con las proteínas y las retira de la solución.

- Cloroformo/isoamilico

Mezclar 240 ml de cloroformo con 10 ml de alcohol isoamilico; agregar 1 volumen de agua destilada y agitar vigorosamente. Conservar en agua.

ACCION: El cloroformo retira el fenol con lo que solo quedan en la solución, los ácidos nucleicos.

El alcohol isoamilico permite eliminar proteínas y restos de membranas celulares que quedan en la interfase entre el solvente orgánico y la fase acuosa. Es importante para la pureza del DNA que se quiere aislar.

- ClNa 3 M

Disolver 174,9 grs. de cloruro de sodio en agua destilada. Llevar a un volumen final de 1000 ml

ACCION: Funciona como quelante del DNA

- Etanol absoluto

ACCION: Cambia la constante dieléctrica del agua, permitiendo separar el DNA de la fase acuosa

PROTOCOLO DE EXTRACCION ENPAPEL NUCLEICO

- Aceite, Es utilizado para poder calentar la muestra a una temperatura constante de 95 °C. De tal manera que se activen los compuestos del papel Nucleico e interactúen para poder obtener el material genético de la muestra

- Agua estéril. Para resuspender el material genético extraído.

PROTOCOLO PARA EXTRACCION EN PAPEL FTA

- Solución de purificación (FTA Purification Reagent). Sirve para eliminar todos los contaminantes que puedan encontrarse en el Papel FTA de tal manera que solo quede el material genético atrapado en dicho papel.
- Agua estéril. Es utilizado para poder lavar los residuos que hayan quedado en la muestra

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- Agarosa 1%

ACCION: Especialmente indicada para la electroforesis de alta resolución en experimentos de Biología Molecular. El rango de separación es de 20 – 2000 pb dependiendo de la concentración de agarosa y el buffer utilizado para la electroforesis.

- Tampón TBE 1X
- Tampón TBE 10 X

Disolver 108 grs. de trisbase, 55grs de ácido bórico y 7, 4 grs. de EDTA disódico en agua destilada. Llevar a un volumen final de 1000 ml.

ACCION: TBE se utiliza como tampón de electroforesis para la separación del DNA bicatenario en geles de agarosa y poliacrilamida. Antes de usarlo se debe diluir en una concentración de 1X o 0,5 X

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

- Poliacrilamida 40%

Pesar 38 g de Archilamida disolver calentando en 60 ml de agua destilada y agregar 2 g de bisacrilamida, llevar a un volumen final de 100 ml.

Bisacrilamida: agente entrecruzador

- Urea, agente desnaturizante permite que las dos hebras de ADN estén separadas.

- TEMED

NNNN´tetrametilen diamina se utiliza como iniciador de la polimerización del gel de Poliacrilamida

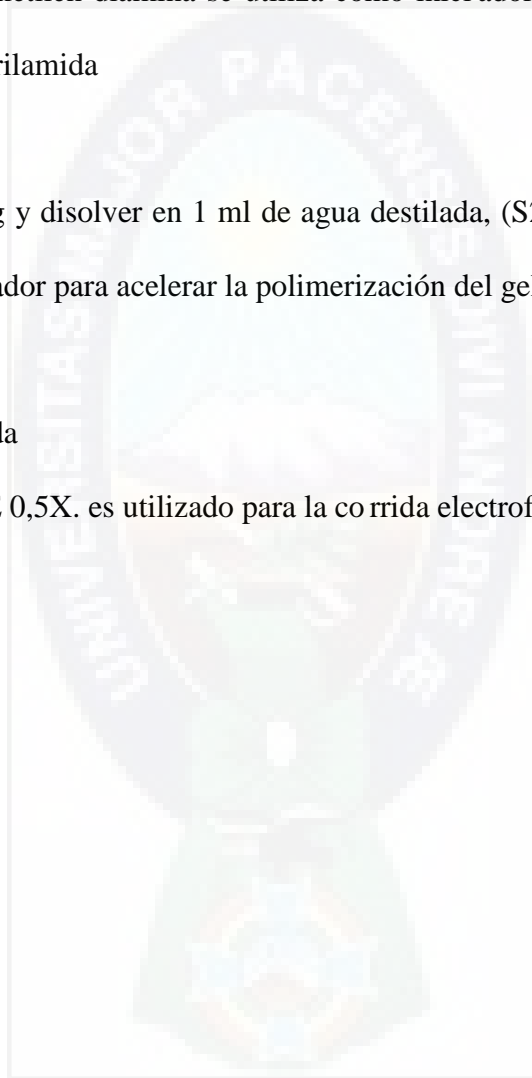
- PSA

Pesar 100 mg y disolver en 1 ml de agua destilada, (S2O8⁻). También es usada como catalizador para acelerar la polimerización del gel.

- TBE 10X

- Agua destilada

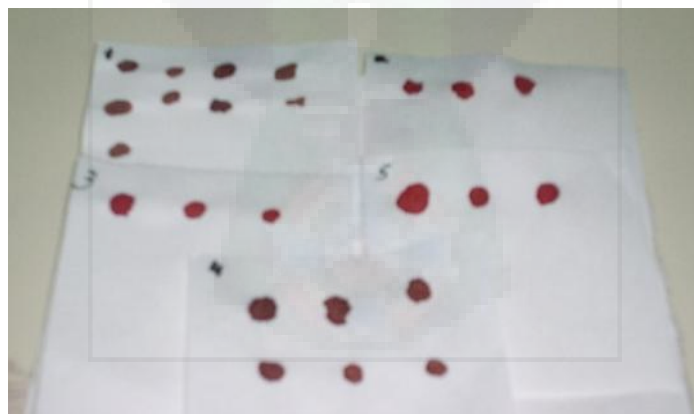
- Tampón TBE 0,5X. es utilizado para la corrida electroforética.



FOTOGRAFIAS DEL TRABAJO REALIZADO



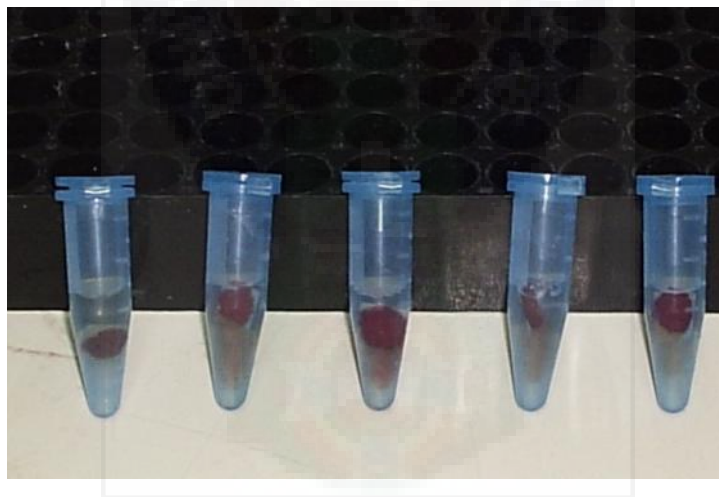
Materiales que fueron utilizados para la toma de muestra.



Muestras de sangre recolectadas en Papel Filtro



Recolección de las muestras de sangre sobre Papel Nucleico y sobre Papel FTA



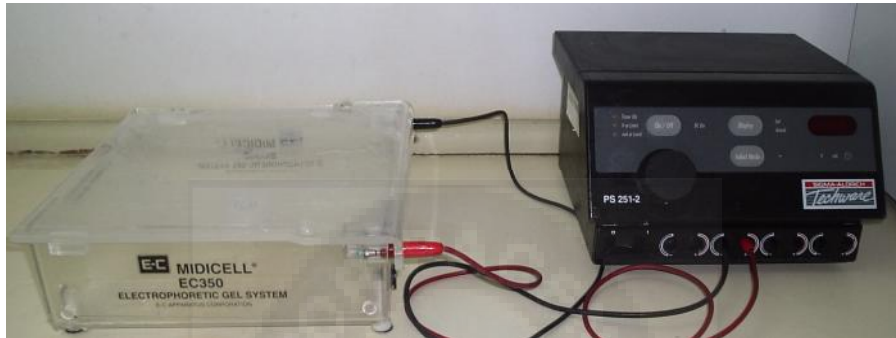
Extracción del Material Genético



Micro Centrifugadora. Marca: EPPENDORF. Centrifuge 5415 C



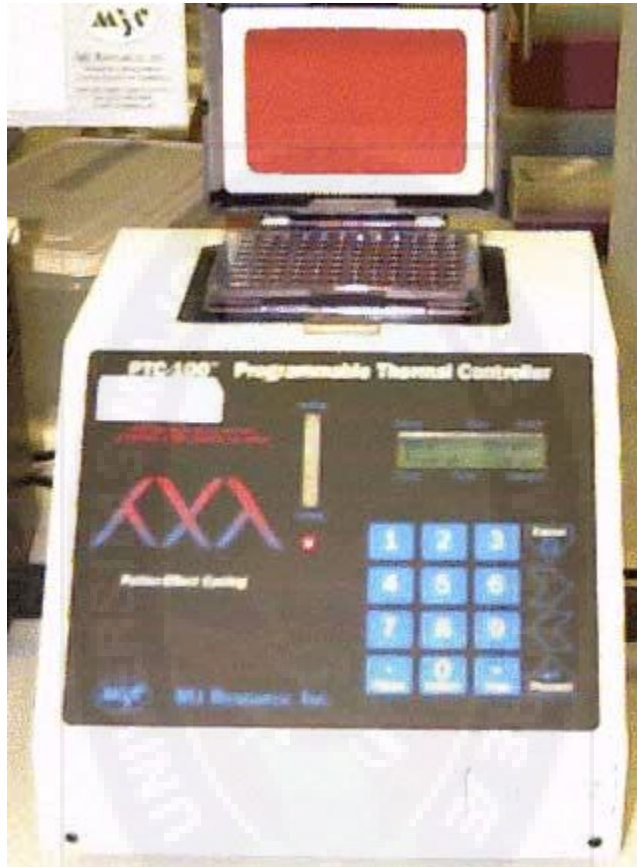
Incubadora




Cámara de Electroforesis Horizontal para Gel de Agarosa



Transiluminador de luz UV. Para poder visualizar el ADN en los geles de agarosa



Termociclador para reacciones de PCR



"COMPARACION DE LA EFICACIA
DE AISLAMIENTO DE ADN
HUMANO A PARTIR DE
MANCHAS DE SANGRE
RECOLECTADAS EN PAPEL
FILTRO WHTMAN N°3, PAPEL
NUCLEICO Y PAPEL FTA"

UNIV: IVANOSKA ZURITA

TUTORA: Dra. SUSANA REVOLLO *PhD.*



ADN



Material genético



Regiones
codificantes y no codificantes

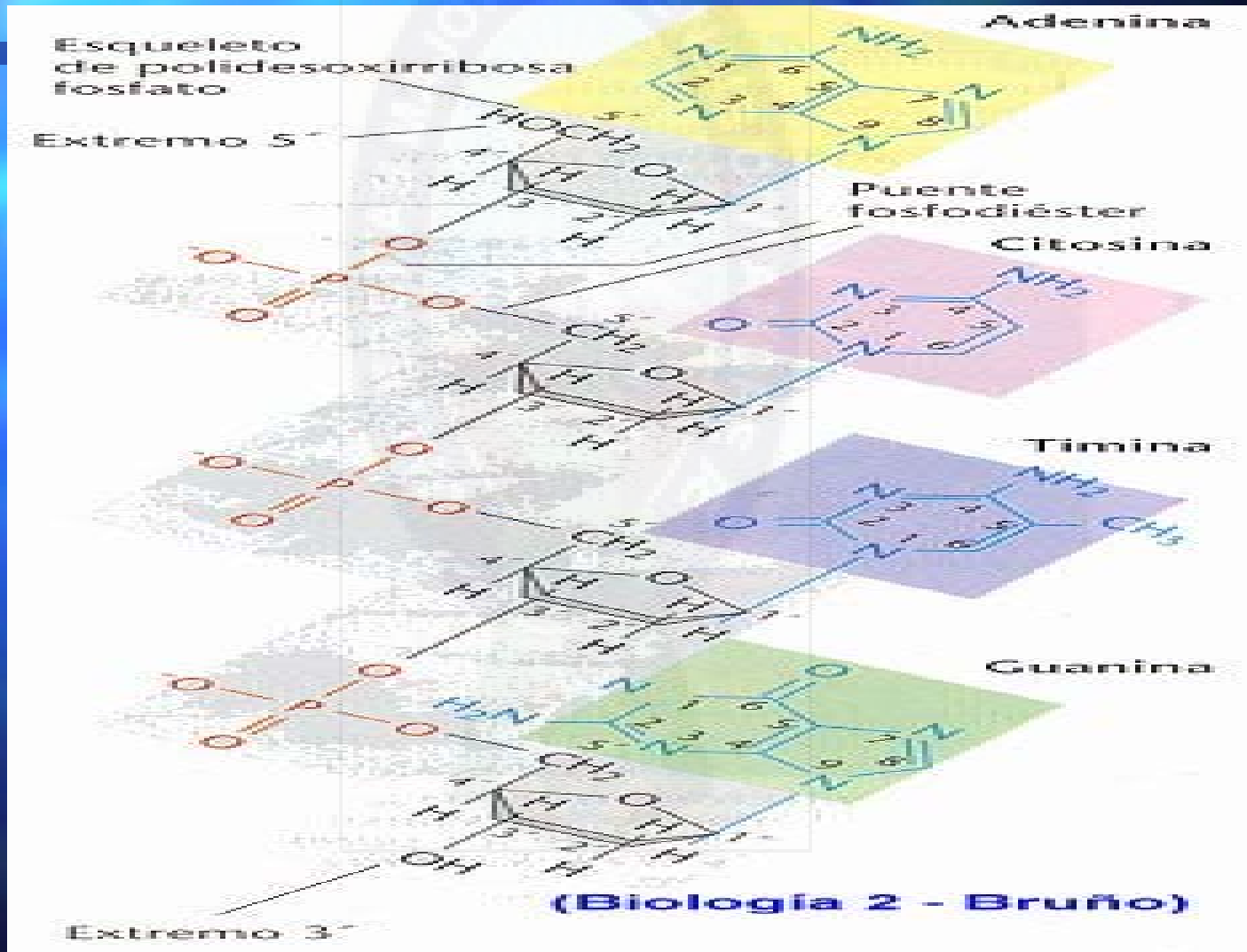


R. No
codificantes polimorficas



Fuente de
marcadores genéticos


MOLECULA DE ADN



STR

STR → Regiones
microsatelites

→ 2 - 7 pb en tandem

alelos STR  350 pb PCR

STR → Polimorfismo
genético de longitud

CROMOSOMA Y


Par 1 2.6 Mb

Región excenta de

recombinación



Par 2 0,32 Mb



OBJETIVO

- Comparar tres tipos de soportes de papel para recolección de muestras con fines de analizar el ADN en la identificación de individuos.



METODO

Recolección de Muestras

Muestras sobre Papel Whatman Nº3

Muestras sobre Papel Nucleico

Muestras sobre Papel FTA

Extracción del
Material Genético

Extracción del
Material Genético

Extracción del
Material Genético

Electroforesis en Gel de Agarosa

Amplificación del ADN por PCR

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

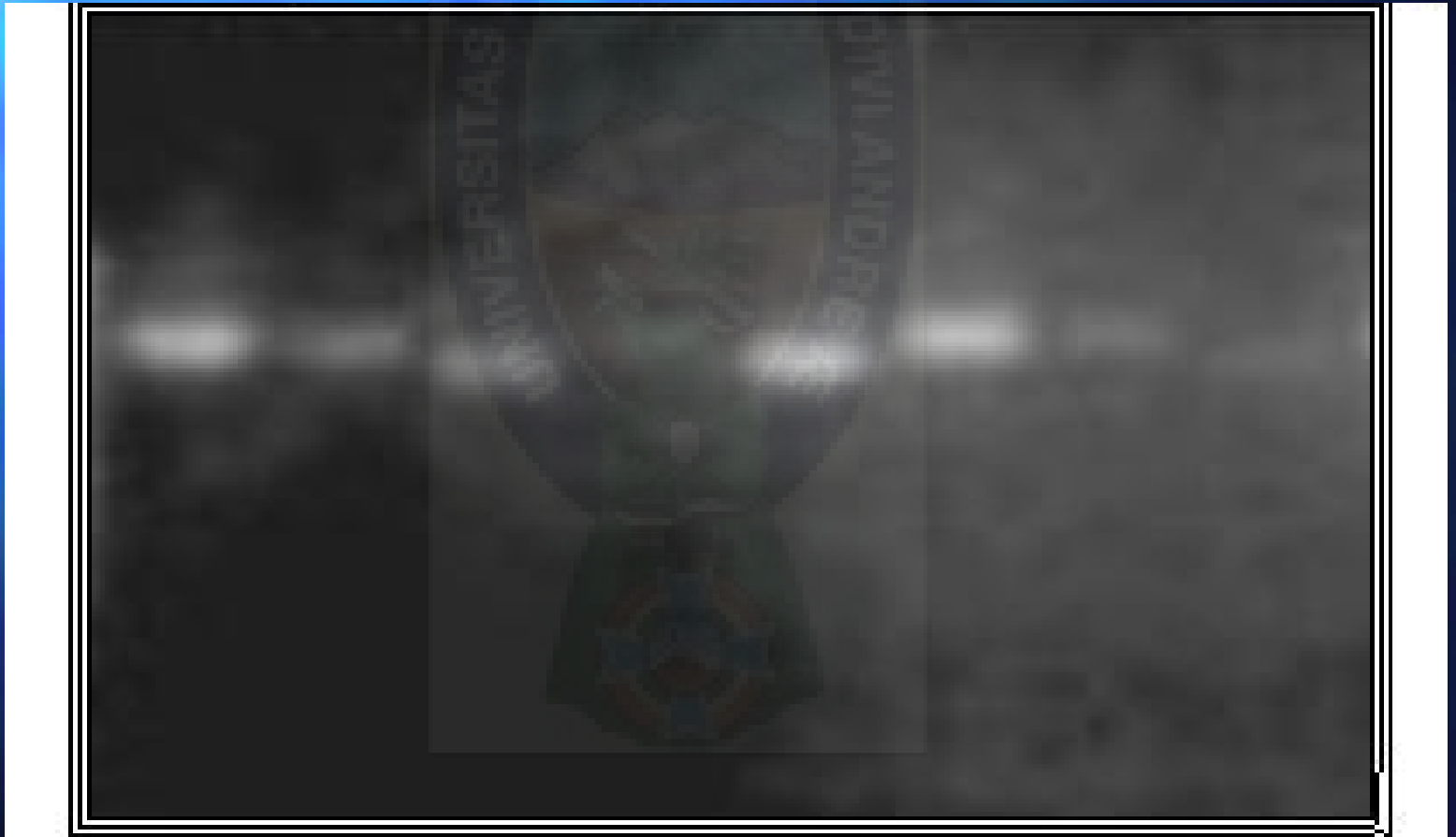




RESULTADOS

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

1 2 3 4 5 6 7 8



ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

DYS 390

DYS 392

E390 1 2 3

E392 4 5 6





CONCLUSIONES



GRACIAS