

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DESCRIPCION DEL ANALISIS DE ADN PARA LA IDENTIFICACION DE
SOSPECHOSOS DE AGRESION SEXUAL PARTIENDO DE SEMEN COMO
EVIDENCIA BIOLOGICA

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD CURSO DE
ESPECIALIZACION

PRESENTADO POR:

NESTOR ENRIQUE GALAN RIVAS
DARLA STEPHANIE PLATERO SOSA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

DICIEMBRE 2022

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO INTERINO

MSC. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL DE PROCESO DE GRADO

MSC. ENA EDITH HERRERA SALAZAR

TRIBUNAL EVALUADOR

LICDA. LORENA MARGARITA RAMÍREZ MERCADO

DRA. TANIA ETHEL CUADRA ZELAYA

TUTORA

MSC. NANCY ZULEYMA GONZALEZ SOSA

INDICE GENERAL

	pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	16
3.1 Conceptos	16
3.1.1 Criminalística	16
3.1.2 Violación	17
3.1.3 Evidencias Biológicas	17
3.1.4 Serología Forense	18
3.1.5 Tipos de muestras serológicas	18
3.2 Descripción la Composición Física y Química del Semen	18
3.2.1 Composición del semen	18
3.3 Espermatozoide	19
3.4 Identificación de semen en la escena del crimen	19
3.4.1 Pruebas de identificación del semen	19
3.5 Composición Química y Estructural del ADN	19
3.5.1 El ADN	19
3.5.2 Aplicación del ADN en la identificación de individuos	20
3.5.3 Composición química del ADN	20
3.6 Estructura Química del Poli-nucleótido de ADN	22

3.6.1	El ADN desde el punto de vista Biológico	23
3.7	Estructura del ADN: la Doble Hélice	24
3.7.1	Modelado de la estructura molecular del ADN por Watson y Crick en Cambridge	24
3.7.2	Regla de Chargaff A=T y G=C	24
3.7.3	La estructura completa del ADN	25
3.8	El ADN Mitocondrial en la Investigación Forense	26
3.9	Polimorfismo del ADN	26
3.9.1	Polimorfismos tipo II: secuencias cortas repetidas en tándem	27
3.10	Marcadores Genéticos En Genética Forense	28
3.10.1	STR (Short Tandem Repeats)	28
3.10.2	Ventajas del análisis de los STR	29
3.10.3	Perfil Genético	29
3.11	Análisis de ADN	29
3.11.1	Objetivo del análisis de ADN	29
3.11.2	Análisis de ADN en semen	30
3.11.3	Recogida de muestras para el análisis de semen	30
3.12	Técnica para la obtención de un perfil genético	32
3.12.1	Extracción del ADN	32
3.12.2	Cuantificación de ADN	33
3.12.3	Amplificación por PCR	33
3.13	Electroforesis Capilar (EC)	34
3.14	Identificación de sospechosos por comparación de perfiles genéticos	34

Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	37
4.1 Tipo de investigación	37
4.2 Desarrollo	37
Capítulo V	
5.0 Propuesta De Practica De Laboratorio	39
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	76
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	78
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pagina N°
1.	Azúcar ribosa presente en el ARN y azúcar desoxirribosa presente en el ADN	21
2.	Bases nitrogenadas del ADN	21
3.	Estructura de las cadenas de ADN	22
4.	Conformación de un nucleótido, monofosfato de adenosina	23

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Estructura del espermatozoide
2. Modelo original en escala de Watson y Crick de la molécula de ADN
3. La doble hélice del ADN
4. Ejemplo de repeticiones en tándem
5. Amplificación exponencial de una secuencia de interés mediante PCR
6. Guía de lineamientos para la presentación del documento escrito de la práctica de laboratorio

RESUMEN

El presente documento, constituye el informe final del proyecto de investigación desarrollado en el curso de especialización denominado “Análisis Químico Aplicado a la Investigación Criminal”, el cual tuvo como objetivo principal dotar a los estudiantes de los conocimientos necesarios para el abordaje de una investigación criminal en general y poder así aplicar los conocimientos de análisis químico en dicha área.

Este proyecto de investigación se basó en un estudio bibliográfico necesario, con el fin de abordar el tema del análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN), esto partiendo de una matriz biológica como lo es el semen, teniendo en cuenta que en los delitos contra la libertad sexual, una de las evidencias que puede dejar un agresor en estos casos es semen, debido a esto, el tema se aborda desde esta perspectiva, por lo que además se abordaron aspectos la composición física y química del semen, así como la estructura del espermatozoide.

Se realiza una descripción del análisis de ADN partiendo de semen como evidencia biológica, El método de análisis de los marcadores más conocidas son las secuencias cortas de ADN (STR), son una buena opción para las evaluaciones de ADN con fines forenses, El objetivo de esto es generar perfil genético que permita identificar a un individuo, esto a partir de una comparación de los perfiles genéticos obtenidos de los sospechosos y a partir de la evidencia.

Uno de los objetivos de la presente investigación fue el de diseñar una propuesta de práctica de laboratorio que pueda ser implementada en la asignatura de “Química Forense y Toxicología” a fin de analizar ADN y generar el perfil genético a partir de una muestra de semen utilizando el análisis de las repeticiones cortas en tandem o por sus siglas en inglés STR (Short Tandem Repeats).

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

El Salvador es uno de los países que registran cifras altas de violaciones sexuales, en el periodo de enero a marzo del 2021 la Fiscalía General de la República registro 736 casos por el delito de violencia sexual. Esto enfatiza la importancia de los estudios de perfiles genéticos que permita la resolución de hechos delictivos de este tipo.

El ADN permite identificar de manera única a cada persona, los individuos de la misma especie comparten gran parte de su secuencia de ADN, pero existen determinadas regiones altamente variables que son propias de cada sujeto, estas zonas del genoma se denominan polimorfismos o marcadores genéticos, y son utilizadas para la identificación de personas ya que dos seres humanos no relacionados es poco probable que tengan en común los mismos marcadores genéticos.

Por otro lado, como una anomalía del ADN, se tienen los casos de quimerismo, este es un trastorno genético en el cual una persona posee dos tipos de células diferentes con diferente material genético, es decir que la persona puede poseer órganos con diferente ADN. Esto puede llegar a dificultar la identificación de un individuo.

Cuando se aborda el estudio forense de un indicio biológico con fines identificativos, se aísla el ADN existente en las células nucleadas, independientemente del fluido, tejido u órgano del cual provenga para su análisis. Es normal en delitos contra la libertad sexual, la presencia de semen en las evidencias recolectadas tanto en el lugar de los hechos como en las prendas o cavidades internas de las víctimas, dada la gran cantidad de células expulsadas en una eyaculación, las posibilidades de individualización de un perfil genético

con fines identificativos son muy altas, por lo que otro aspecto importante a abordar en esta investigación es el tema de las generalidades del semen.

En cuanto a las posibles situaciones en las cuales se puede encontrar el semen como vestigio es de vital importancia confirmar la identidad del fluido mediante análisis químicos tales como la enzima fosfatasa ácida (FA) que indica presencia presuntiva de semen y proteína seminal P-30 como prueba confirmativa.

Las metodologías analíticas y los marcadores más conocidos son las secuencias cortas de ADN, siendo estos los de elección en las evaluaciones de ADN con fines forenses. Al examinar varias Repeticiones Cortas de Tandem (STR por sus siglas en inglés), se genera un código numérico que conocemos como perfil genético, es el que sirve para descartar o establecer relaciones de parentesco, para vincular a un sospechoso con evidencia obtenida de una escena de crimen. Con base en lo anterior, se diseñó una propuesta de práctica de laboratorio, en la cual se detalló el proceso para obtención del perfil genético.

Este proyecto se desarrolló como producto final del curso de especialización de “Análisis Químico Aplicado a la Investigación Criminal”, de la Facultad de Química y Farmacia que fue ejecutado en un periodo de 6 meses bajo modalidad a distancia.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Describir el análisis de ADN para la identificación de sospechosos de agresión sexual partiendo de semen como evidencia biológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 2.2.1 Buscar fuentes bibliográficas que contengan la información necesaria acerca del análisis del ADN en muestra de semen para la identificación de personas, seleccionando la información que más se adecue al tema a investigar mediante la lectura, análisis e interpretación del material recopilado.
- 2.2.2 Explicar el procedimiento general de STR (del inglés Short Tandem Repeat), y de esta manera en un futuro capacitar a los estudiantes que cursen asignatura Química Forense y Toxicología acerca de marcadores moleculares utilizados en la identificación de personas a partir de muestras de semen para generar un perfil genético.
- 2.2.3 Proponer una práctica de laboratorio, para ser implementada en la asignatura Química Forense y Toxicología, a fin de analizar el ADN a partir de una muestra de semen utilizando el análisis de las STR (del inglés Short Tandem Repeat).

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

Para la investigación de un crimen de agresión sexual es necesaria la intervención judicial y la científica, esta última se encargará de realizar los análisis de laboratorio para la identificación de un agresor sexual.

Es importante mencionar las instituciones involucradas en la investigación de un caso de agresión sexual, estas son en el Instituto de medicina legal Dr. Roberto Masferrer y la División Técnica Científica de la Policía Nacional Civil. Donde a través del Laboratorio de la División Policía Técnica y Científica (DPTC) de la Policía Nacional Civil (PNC), y El Laboratorio del Instituto de Medicina Legal “Dr. Roberto Masferrer” se realizan los diferentes análisis de evidencias biológicas.

3.1 Conceptos.

3.1.1 Criminalística.

La Criminalística es ciencia auxiliar del Derecho Penal y del Proceso Penal, que se ocupa del descubrimiento y verificación científica del delito y del delincuente.

La criminalística tiene por objeto la investigación técnica-científica de los hechos presuntamente delictivos, identificando a sus autores, víctimas y demás involucrados, señalando los elementos utilizados y sus manifestaciones, reconstruyendo las maniobras que se pusieron en juego, y aportando los elementos de prueba a los organismos que administran la justicia.

Mediante procedimientos científicos, esclarece el Dónde, Cómo, Cuándo y Quien. Así se ha podido coleccionar y acopiar las evidencias físicas, la reconstrucción de un hecho, la identificación del sujeto con el escenario del suceso y estableciendo las causas probables del delito¹.

La criminalística es la ciencia que estudia los indicios dejados en el lugar del

delito, gracias a los cuales puede establecerse, en los casos más favorables, la identidad del criminal y las circunstancias que concurrieron en el hecho delictivo².

3.1.2 Violación.

La violación, es un delito contra la libertad sexual cuya acción consiste en el acceso carnal llevado a cabo en circunstancias tipificadas por la ley. Libertad sexual, es el derecho de todo individuo de disponer de su propio cuerpo para fines sexuales, con quien se quiera, cuando se quiera, como se quiera, donde se quiera. Pero, respetando los derechos del otro y con madurez¹.

La violación atenta contra la integridad física, emocional y estabilidad emocional, familiar y social de la persona agredida. Interfiere y modifica el curso de su vida, con repercusiones a otros niveles. Problemas tales como el embarazo indeseado, embarazo precoz, contagio de enfermedades de transmisión sexual y disminución del rendimiento escolar o laboral-ocupacional, entre otros; muestran que las consecuencias de la violación van más allá de lo privado o particular y pasan a ser un problema público¹.

El Código Penal, DECRETO N° 1030 de EL Salvador, en el Art. 158. Determina: El que mediante violencia tuviere acceso carnal por vía vaginal o anal con otra persona, será sancionado con prisión de seis a diez años

3.1.3 Evidencias Biológicas.

Es un tipo de evidencia física, esta provee información sobre la identidad de los sujetos implicados en un acto criminal. El objeto de estudio se centra en el análisis de los restos de sangre, fluidos corporales (saliva o semen), piel o cabellos con el fin de determinar el ADN de los autores del crimen y/o cómplices.

Las evidencias biológicas son importantes para identificación de individuos ya que esta contiene ADN. Los tipos de evidencias biológicas son: semen, sangre,

cabellos, saliva, sudor y piel.

3.1.4 Serología Forense.

Es una rama de la criminalística que estudia los diferentes fluidos biológicos, que pueden estar relacionados con investigaciones criminales, los cuales son encontrados en forma líquida y/o en forma de manchas secas.

Con el resultado de estos análisis se puede asociar o no a un individuo en la participación de un hecho delictivo de manera presunta, no en forma concluyente, debido a que mediante estas pruebas no se puede individualizar a una persona³.

3.1.5 Tipos de muestras serológicas.

Los tipos de evidencias serológicas pueden ser: fluidos vaginales, heces, orina, sangre, semen, saliva y sudor.

3.2 Descripción la Composición Física y Química del Semen.

3.2.1 Composición del semen.

El semen o esperma es un fluido corporal de aspecto viscoso y blanquecino que es expulsado a través de la uretra durante la eyaculación. Está constituido por células, los espermatozoides, suspendidos en una fase líquida, el fluido o plasma seminal, que contiene gran cantidad de sustancias, tales como metales (zinc, calcio, sodio y potasio), ácidos orgánicos (cítrico y ascórbico), algunas enzimas (como la fibrinolisina y la fosfatasa ácida y alcalina), proteínas, hormonas, fósforo, flavinas, prostaglandinas, colina, albúmina, alfa, gamma y beta globulinas, lecitina, ácidos grasos, antígeno soluble de grupo sanguíneo, siendo además rico en fructosa. Los espermatozoides se producen en los testículos, mientras que el plasma seminal se forma por el aporte de distintos órganos y glándulas, entre los que se encuentran los testículos y la próstata⁴.

3.3 Espermatozoide.

La estructura del espermatozoide humano es muy característica (ver anexo N° 1), distinguiéndose claramente tres partes: las que se conocen como cabeza y cola (flagelo) en los extremos, y entre ellas una pieza central. Los espermatozoides se mueven, nadando en el líquido seminal y en los fluidos vaginales mediante el movimiento del flagelo, impulsado por la pieza central que actúa a modo de motor ⁴.

3.4 Identificación de semen en la escena del crimen.

Se deberá localizar manchas de fluidos y determinar su origen, las manchas de semen tienen un aspecto característico. Además, ciertos componentes de este fluido corporal, como son las flavinas, tienen propiedades luminiscentes, con lo que se puede detectar el semen con luz ultravioleta⁴.

3.4.1 Pruebas de identificación del semen.

Los siguientes son los métodos de identificación de semen: Métodos ópticos: microscopía, Prueba de la fosfatasa ácida, Ensayos cristalográficos, Pruebas inmunológicas con la proteína P30⁴.

3.5 Composición Química y Estructural del ADN.

3.5.1 El ADN.

El genoma está localizado en el núcleo de la célula y una pequeña porción en la mitocondria. Cada célula de nuestro organismo posee 46 cromosomas (23 pares) formados por ADN (ácido desoxirribonucleico) que contienen en sus complejas estructuras el Código Genético¹.

ADN son las siglas de Ácido Desoxirribonucleico y es así como normalmente se le designa (o también como DNA, del inglés DesoxiriboNucleic Acid). Junto con

el ARN (Ácido Ribonucleico) forma el grupo de biomoléculas llamadas ácidos nucleicos. Dejando este último, nos centraremos en el ADN, cuyo papel fundamental en los organismos vivos es el de transmitir toda la información hereditaria de una generación a la siguiente⁴.

3.5.2 Aplicación del ADN en la identificación de individuos.

La utilización de del material genético (ADN) para la identificación de personas, se obtiene a partir de lo que se ha denominado como, huella digital del ADN, de igual manera lo podemos denominar como perfil de ADN o perfil genético.

Este Perfil de ADN ha demostrado que es prácticamente único e irrepetible, a excepción de los gemelos monocigotos, lo que permite diferenciar a cualquier persona de otra y establecer una relación de parentesco. Las aplicaciones de la prueba de ADN son diversas, pero se destacan dos: la prueba de paternidad y los análisis forenses, este último en casos criminales para establecer la relación del sospechoso con la evidencia dejada en la escena de un crimen (manchas de sangre, semen o saliva) para incriminarlo o en su caso, exonerarlo. También se utiliza para la identificación de víctimas en accidentes masivos como los desastres aéreos. El ADN puede servir como huella genética y ser analizado en muestras de gran antigüedad. De manchas de sangre y semen de 3 a 5 años de antigüedad es perfectamente posible obtener ADN suficiente para aislar huellas genéticas capaces de determinar la identificación individual¹.

3.5.3 Composición química del ADN.

Desde el punto de vista simplemente químico, el ADN es un polímero, es decir, una larga cadena de gran cantidad de unidades enlazadas entre sí. En este caso cada una de estas unidades es un nucleótido, por lo que el ADN es un polinucleótido. Cada nucleótido está constituido, a su vez, por una azúcar, una base nitrogenada y un resto de ácido fosfórico.

El azúcar: Se trata de desoxirribosa (concretamente, de 2-desoxirribosa), monosacárido de 5 átomos de carbono (es decir, una pentosa), de fórmula $C_5H_{10}O_4$. Es precisamente este azúcar el que marca una de las diferencias fundamentales entre el ADN y el ARN, ya que en este último el azúcar es la ribosa.

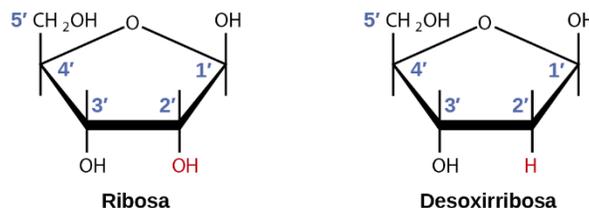


Figura N° 1. a) Azúcar ribosa presente en el ARN, b) azúcar desoxirribosa presente en el ADN⁴.

Bases nitrogenadas: Purinas son bases nitrogenadas, estas son compuestos orgánicos heterocíclicos aromáticos, está compuesta por dos anillos fusionados. Pirimidina base nitrogenada que está compuesta por un solo anillo heterocíclico. Las bases nitrogenadas que entran a formar parte del ADN son cuatro, que se representan abreviadamente por su inicial: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). Todos ellos son compuestos heterocíclicos y aromáticos, con dos o más átomos de nitrógeno como heteroátomos. Aquí hay otra diferencia con el ARN, ya que en éste las bases nitrogenadas son las mismas, con excepción de la timina, que es sustituida por el uracilo (U)⁴.

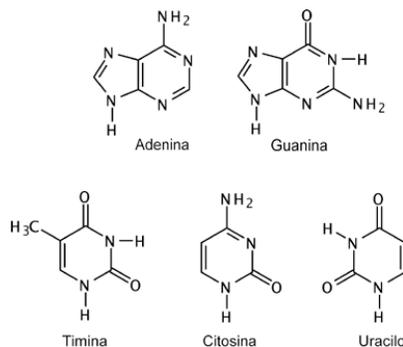


Figura N° 2. Bases nitrogenadas del ADN⁴.

El resto fosfórico: Se trata del grupo fosfato PO_4^{3-} , derivado del ácido fosfórico (H_3PO_4).

3.6 Estructura Química del Poli-nucleótido de ADN.

El ADN se presenta como una doble cadena (hebras) de nucleótidos. El soporte de cada hebra está constituido por unidades alternas de grupos fosfato y azúcar, que resultan ser así la columna vertebral de cada hebra. Los azúcares se unen entre sí a través de un grupo fosfato, que forma dos enlaces (fosfoester) (ver figura No.4). El grupo fosfato se une al carbono 5' de un azúcar y al 3' del azúcar siguiente (los números de los carbonos del azúcar llevan el apóstrofe ' para diferenciarlos de la numeración de las bases nitrogenadas).

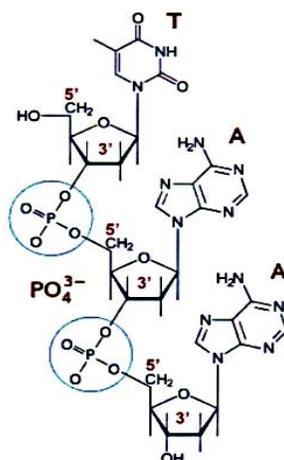
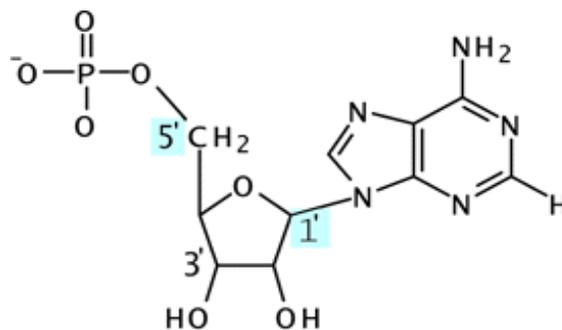


Figura N° 3. Estructura de las cadenas de ADN⁴.

A ese soporte se unen lateralmente las bases nitrogenadas, una por cada resto de azúcar, mediante un enlace entre el OH de éste de la posición 1' y el NH de la base. La base será, pues, como la rama de un árbol que sale del tronco⁴.



Monofosfato de Adenosina

Figura N° 4. Conformación de un nucleótido, monofosfato de adenosina⁴.

Nucleósido = Pentosa + Base nitrogenada.

Nucleótido = Pentosa + Base nitrogenada + Ácido fosfórico.

Polinucleótido = Nucleótido + Nucleótido + Nucleótido +

3.6.1 El ADN desde el punto de vista Biológico.

Walter Stanborough Sutton (médico y genetista estadounidense, 1877-1916) y Theodor Heinrich Boveri (biólogo alemán, 1862-1915), independientemente, proponen en el período 1902-1903 que las unidades de herencia (genes) están localizados en los cromosomas, integrados por ADN y proteínas (histonas). La propuesta resultó controversial hasta su confirmación en 1915 por los trabajos de Thomas Hunt Morgan (genetista estadounidense, 1866- 1945) sobre la herencia y cruce de cromosomas parentales en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), siendo posteriormente reconocida como teoría cromosómica de la herencia o teoría de Sutton-Boveri. La teoría identifica los cromosomas con los factores (alelos) apareados requeridos por las Leyes de Mendel de la herencia. También establece que los cromosomas poseen una estructura lineal con los genes localizados en sitios específicos a lo largo de ellos⁵.

Las células contienen cromosomas, constituidos por proteínas y sobre todo por ADN. En cada célula diploide del ser humano existen 23 pares de cromosomas, y en cada par un cromosoma procede del padre y el otro de la madre. En los 23

pares de cromosomas hay aproximadamente 3.000 millones de pares de bases. Como en nuestro cuerpo hay unos 60 billones de células, podemos hacernos idea de la enorme cantidad de ADN que poseemos⁴.

3.7 Estructura del ADN: la Doble Hélice.

3.7.1 Modelado de la estructura molecular del ADN por Watson y Crick en Cambridge.

Durante los meses de abril-mayo de 1951, Watson visita la Estación Zoológica de Nápoles, Italia. Durante la última semana de su estadía atiende un congreso sobre la determinación de la estructura 3-D de moléculas por métodos de difracción de rayos-X. Allí llama su atención una comunicación de Wilkins sobre difracción de rayos-X en ADN que lo convence que sólo a través de esta herramienta puede determinarse la estructura molecular del ácido nucleico. Watson y Crick deciden dilucidar la estructura molecular del ADN mediante modelización consistente con los datos experimentales accesibles⁵.

3.7.2 Regla de Chargaff A=T y G=C.

El aspecto más importante de la asociación en pares de las bases es que sólo ciertos pares pueden formar parte de una doble hélice de diámetro uniforme. Un miembro del par debe ser una base de mayor tamaño purina y, complementariamente, la otra la más pequeña pirimidina. Si el par consistiera de dos purinas, la hélice mostraría allí un ensanchamiento; si consistiera en dos pirimidinas, la hélice tendría un estrechamiento. La optimización de los enlaces de hidrógeno llevaría a una restricción adicional: los únicos pares de bases posibles son: Adenina (A) con Timina (T), Guanina (G) con Citosina (C), siendo esta la Regla de Chargaff.

Watson y Crick propusieron que la molécula de ADN toma la forma de una doble hélice dextrógira (como la espiral de un tirabuzón común) que recuerda una

escalera algo retorcida a lo largo de su extensión (ver anexo N° 2). Las barandas de la escalera están hechas de grupos químicos fosfato y azúcar desoxirribosa ligados covalentemente entre sí y dispuestos de manera alternada para formar una estructura polimérica. Los peldaños están compuestos de un par de bases nitrogenadas (que se proyectan hacia el eje de la hélice desde sendos azúcares sobre hélices opuestas) enlazadas entre sí por puentes de hidrógeno⁵.

3.7.3 La estructura completa del ADN.

En los organismos vivos las dos hebras están dispuestas en el espacio en una doble hélice, a modo de dos cables enrollados entre sí, pero en direcciones contrarias. Es decir, en esta doble hélice la dirección de los nucleótidos en una hebra (3' - 5') es opuesta a la dirección en la otra hebra (5' - 3'), organización que se denomina antiparalela (ver anexo N° 3). Las bases nitrogenadas se disponen hacia el interior de cada hebra, las cuales quedan unidas entre sí por enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de una y otra. No obstante, esta interacción entre las bases de cada hebra no puede ser cualquiera, ya que la citosina sólo puede unirse con la guanina, y la adenina con la timina, por lo que se las denomina bases complementarias. Es decir, los enlaces de hidrógeno son C-G y A-T, o combinaciones de pares de bases complementarias⁴.

En cuanto a cómo se secuencian las bases en la cadena de ADN, no hay restricción alguna: por ejemplo, pueden ser secuencias TGAT, CACT, GCTT, etc. Cabe, pues, un enorme número de combinaciones posibles dentro de la cadena del ADN. Lo que sí marcará cada una de esas secuencias es la del par complementario en la otra cadena, es decir, de lo que se llama hebra complementaria. Así, en el ejemplo anterior las secuencias de bases en la hebra complementaria serían ACTA, GTGA, CGAA, respectivamente⁴.

3.8 El ADN Mitocondrial en la Investigación Forense

Las células de todo ser humano existen dos tipos de ADN: el ADN nuclear y el ADN mitocondrial (ADNmt). Aunque ambos sean la misma sustancia desde el punto de vista químico, entre ellos hay importantes diferencias:

ADN nuclear: Se encuentra en el núcleo de las células y es el ADN cromosómico, que contiene todos los genes responsables de la herencia. El ADN nuclear es el que se emplea en investigación forense para obtener el perfil de una persona, y también para realizar las pruebas de paternidad. ADN mitocondrial: Se encuentra dentro de un orgánulo de la célula llamado mitocondria, encargado de producir la energía que aquélla necesita. Con él sólo se pueden analizar los parentescos por vía materna⁴.

3.9 Polimorfismo del ADN

El polimorfismo, en lo que se refiere a la genómica, es la presencia de dos o más formas variantes de una secuencia específica de ADN que puede producirse entre diferentes personas o poblaciones. El tipo más frecuente de polimorfismo implica la variación en un nucleótido único (también denominado polimorfismos de nucleótido único, o SNP). Otros polimorfismos pueden ser mucho más grandes y abarcar segmentos más largos de ADN.

Los polimorfismos de ADN se pueden ordenar según dos criterios básicos: su propia naturaleza y el sistema de detección. De este modo se podrían distinguir:

- Tipo I: Fragmentos de restricción de longitud variable (RFLPs). La causa del polimorfismo radica normalmente en la pérdida de una o más dianas de restricción debido a mutaciones puntuales (transiciones o transversiones).
- Tipo II: Repeticiones en tándem de secuencias cortas (STRs). En este caso el polimorfismo consiste en la existencia de un número variable de

repeticiones en tándem de una secuencia básica que oscila entre un solo nucleótido y una kilobase.

- Tipo III: Polimorfismos debidos a mutaciones puntuales que no afectan a la longitud de los fragmentos de restricción ni alteran la secuencia de ninguna diana conocida⁶.

3.9.1 Polimorfismos tipo II: secuencias cortas repetidas en tándem.

Este tipo de secuencias ha sido bautizado con diferentes nombres, pero parece bastante aceptada la separación en dos categorías según el tamaño de la unidad repetida y el sistema de detección. Cuando la unidad básica es de unas pocas bases (entre una y seis) se suelen denominar microsatélites o polimorfismos de longitud de secuencia simple. Si la unidad de repetición es mayor (normalmente entre 10 y 15 pares de bases), se habla de mini satélites o repeticiones en tándem de número variable (VNTR). Este tipo de polimorfismos se ven favorecidos por la ocurrencia de "crossing-over" desiguales y otros mecanismos moleculares (como el "slippage" durante la replicación) que contribuyen a su extensión.

De las dos categorías consideradas, los mini satélites son lógicamente menos polimórficos y, curiosamente, tienden a estar agrupados en las regiones proterminales de los cromosomas humanos. Pueden distinguirse fácilmente mediante Southern blot e hibridación, pero los más pequeños necesitan ser amplificados mediante PCR. Fue precisamente el desarrollo de esta técnica (PCR), que permitía amplificar segmentos cortos de ADN con gran rapidez y eficacia, lo que hizo posible el descubrimiento de los microsatélites.

Según Beckman & Weber el 76% de las unidades básicas de repetición son A, AC, AAAN y AG (siendo N cualquier nucleótido). Los microsatélites AC son los más frecuentes; aparecen cada 30 kilobases y se distribuyen por igual en las regiones 5'y 3' no traducibles de los genes y en las regiones intrónicas. Como dato anecdótico, el 80% de las repeticiones A, AAAN y AAN, Y el 50% de los

microsatélites AT, se han encontrado en el extremo 3' de elementos Alu. En el cromosoma X se han descrito microsatélites de 3 y 4 pares de bases cada 300-500 kilobases, aunque esta misma cadencia parece repetirse por todo el genoma humano⁶.

3.10 Marcadores Genéticos En Genética Forense.

3.10.1 STR (Short Tandem Repeats).

Los marcadores más empleados para realizar una prueba de ADN son los microsatélites, repeticiones cortas en tándem o STR. Como su nombre lo dice, los STR se componen de secuencias repetidas cortas (p. ejem. GATC) que dan lugar a diversos alelos que se nombran por el número de veces que se encuentre la secuencia repetida; por ejemplo, el alelo tres presentará tres veces la secuencia GATC (es decir, GATC, GATC, GATC), con la misma lógica para todos los alelos.

Los marcadores de elección en genética forense son los STR tetranucleótidos, es decir, que su unidad de repetición mide cuatro pares de bases (p. ejem. GCTG). Éstos tienen la ventaja, respecto a los dinucleótidos (p. ejem. GA) o trinucleótidos (p. ejem. GCT), por generar menos artefactos durante la amplificación conocidos por su nombre en inglés como stutter, que significa tartamudeo. Los stutter resultan del deslizamiento de la polimerasa durante la PCR, amplificando un fragmento adicional que mide una unidad de repetición menos que el alelo real. En los STR di y tri nucleótidos, los stutter suelen ser muy grandes, casi igual o hasta mayores que el alelo real, lo que provoca genotipos no reproducibles o difíciles de interpretar. En cambio, los STR pentanucleótidos son muy estables y casi no generan stutter, pero generan productos de amplificación más grandes que suelen no amplificarse cuando el ADN esta parciamente degradado⁷ (ver anexo N° 4).

3.10.2 Ventajas del análisis de los STR.

Por su tamaño pequeño, los marcadores STR se podían amplificar fácilmente ofreciendo mayor robustez y sensibilidad ya que permitían obtener resultados a partir de cantidades mínimas de ADN molde (0.5 a 1 ng), lo cual es crucial en investigaciones criminales y desastres masivos. Los amplificadores de PCR se detectaban por electroforesis tradicional en una superficie de soporte (gel), donde las muestras se separaban bajo la acción de un campo eléctrico según su carga, forma y peso molecular; los fragmentos más pequeños corren más rápido mientras los grandes migran más lento y se retrasan. Finalmente, se aplicaba una tinción para evidenciar los fragmentos de ADN en forma de bandas, y se utilizaba una escalera de alelos como referencia (en inglés, ladder) para determinar el genotipo de los individuos⁷.

3.10.3 Perfil Genético

Un perfil genético no es más que un patrón de fragmentos cortos de ADN ordenados de acuerdo a su tamaño que son característicos de cada individuo. La mayoría de los perfiles de ADN que se obtienen en los laboratorios forenses se basan en el estudio simultáneo de un conjunto de 10 a 17 regiones cortas del ADN nuclear, que están distribuidas en los distintos cromosomas humanos y que presentan una alta variabilidad de tamaño entre los distintos individuos. Se trata de pequeñas regiones de 100-500 nucleótidos compuestas por una unidad de 4-5 nucleótidos que se repite en tandem “n” veces. El número de veces que se repite esta unidad de secuencia presenta una gran variabilidad entre los individuos de una población⁸.

3.11 Análisis de ADN

3.11.1 Objetivo del análisis de ADN.

Las pruebas de ADN a partir de evidencias biológicas tienen como objetivo la identificación de individuos, en la criminalística su objetivo es la identificación de

sospechosos, esto a partir de la comparación de los resultados obtenidos, se genera un perfil genético del sospechoso y se compara con el perfil genético obtenido a partir de la evidencia.

3.11.2 Análisis de ADN en semen

En cualquier caso, cuando en un delito contra la libertad sexual se evidencia la presencia de espermatozoides en las muestras recogidas tanto en el lugar de los hechos como sobre las prendas o cavidades internas de víctimas, dada la gran cantidad de células expulsadas en una eyaculación, las posibilidades de individualización de un perfil genético con fines identificativos son muy altas

3.11.3 Recogida de muestras para el análisis de semen⁹.

Como cualquier otro vestigio biológico, el éxito en la obtención de ADN a partir de semen comienza con su recogida, procurando hacerlo en óptimas condiciones y garantizando su correcta conservación, para que una vez enviadas al laboratorio, este pueda ser analizado con garantías de éxito.

En cuanto a las posibles situaciones en las cuales podemos encontrar el semen como vestigio con fines identificativos, pasamos a comentar unas recomendaciones para su recogida y correcta conservación:

- Semen líquido: Normalmente es obtenido de las propias víctimas por especialistas médicos o por el propio médico forense en hospitales, mediante el conocido como lavado vaginal, que consiste en un lavado de la cavidad vaginal de la víctima de una agresión sexual, utilizando suero fisiológico para recoger todo resto biológico que se encuentre en el interior de la vagina, para ser almacenado y remitido en envases de plástico con tapa hermética sin medios conservantes. Será imprescindible para evitar la proliferación de microorganismos, que se remitan refrigerados, evitando su exposición al sol y a altas temperaturas. Este lavado también puede ser

rectal, cuando la agresión sexual con penetración se haya producido por esta vía.

También es posible encontrar el semen líquido en los preservativos utilizados para la comisión de agresiones.

Para este caso, se puede recurrir a dos opciones no excluyentes de remisión: la primera de ellas consiste en la recogida del semen del interior del preservativo mediante el uso de hisopo/torunda, para una vez seco, remitirlo en envases porta torundas que existen al efecto. Y una segunda opción más adecuada por el mayor abanico de posibilidades analíticas que ofrece al especialista, consiste en anudar el preservativo para evitar el derramamiento del líquido interior y remitirlo en envase de plástico, siempre en condiciones refrigeradas, para poder realizar un estudio tanto del semen contenido en el preservativo, como de los restos celulares existentes en la cara externa del mismo, de donde es posible individualizar el perfil genético de la víctima, alcanzando de esta manera un estudio analítico más completo que redundará en conclusiones más precisas en el informe pericial.

- Sobre superficie absorbente: El semen, al entrar en contacto con tejidos o materiales porosos, tiende a secarse y quedar adherido. En estos casos, basta con remitir todo el soporte sobre el que se ha quedado impregnado y si no fuera posible por su volumen, recortar la mancha superando el contorno unos 3 cm, para remitirlo en caja o envase de cartón, procurando que no quede expuesto al sol ni a altas temperaturas. En este supuesto conviene puntualizar, que en el caso de que el semen aparezca sobre prendas, tanto íntimas como externas de la víctima, deberán ser remitidas completas para maximizar las posibilidades analíticas; esto es, en el caso de que finalmente no se encuentre semen, se podrá abordar el estudio de otros vestigios biológicos que son fácilmente transferidos por el agresor a

las ropas de la víctima en este tipo de delitos, como son saliva, restos celulares, pelos arrancados, sangre, etc.

- Si el soporte estuviera aun húmedo por encontrarse en lugar con agua o humedad, debe dejarse secar en una zona no soleada y ventilada, evitando que entre en contacto con otros vestigios, para una vez seco, poder empaquetarlo sin problema de deterioro también en envase de cartón. En el caso de que el semen se encontrara sobre una pared porosa (yeso), basta con obtener la lasca completa y remitirla en un sobre, o utilizar un hisopo/torunda humedecida en agua, para recoger todo el semen posible, remitiendo el mismo en los envases de cartón porta torundas que existen al efecto.
- Sobre superficie no absorbente: Cuando el semen cae sobre muebles, paredes no porosas o cualquier otro objeto, tiende a secarse formando una mancha costrosa transparente con relieve, que puede recogerse utilizando un hisopo/torunda ligeramente humedecida en agua, para recoger todo el semen posible, remitiendo el mismo en los envases de cartón porta torundas que existen al efecto.

3.12 Técnica para la obtención de un perfil genético.

Las técnicas básicas utilizadas por los genetistas forenses para obtener un perfil genético, enfatizando las peculiaridades de estas cuando se aplican a identificación humana.

3.12.1 Extracción del ADN⁷.

- Lisis celular, es decir, la destrucción de las células, ya sea epiteliales (por ejemplo: semen.). Este paso en muchos casos requiere un paso previo para obtener las células, de sangre separar los leucocitos (que si tienen ADN) de los eritrocitos (sin ADN); de osteocitos, descalcificar el hueso; de tejido desintegrarlo y homogeneizarlo, entre otros.

- Purificación, para separar al ADN de las proteínas y los restos celulares que dejó la lisis celular previa.
- Precipitación, que consiste en separar al ADN mediante su deshidratación en alcohol absoluto y dejarlo secar.
- Resuspensión, para rehidratar el ADN con una solución que lo protege de la posible degradación.

3.12.2 Cuantificación de ADN.

Una de las técnicas más sencillas es la espectrofotometría, la cual se puede realizar con cantidades mínimas de muestra (1 μ L). Además de la concentración, se estima la pureza del ADN en cuanto a la presencia de sales o proteínas que pudieran interferir posteriormente para obtener un perfil genético⁷.

Existen múltiples técnicas para cuantificar el ADN, aunque en criminalística se está imponiendo la denominada del slotblot, que posee dos grandes ventajas en muestras forenses. Por un lado, permite detectar cantidades muy pequeñas de ADN, como 100 pg (1 picogramo = 1×10^{-12} g; es el resultado de dividir 1g 1 billón de veces)².

3.12.3 Amplificación por PCR⁷.

El objetivo de la reacción en cadena de la polimerasa, más bien conocida por sus siglas en inglés como PCR (del inglés, polimerase chain reaction), consiste en amplificar o generar millones de copias secuencias del genoma (ver anexo N° 5), en este caso STR lo que genera el perfil genético. La PCR consiste en 25-30 ciclos en los que suceden los siguientes tres pasos en cada ciclo:

- Desnaturalización, por calor se desnaturalizan (separan) las cadenas de ADN.

- Alineamiento de los iniciadores o primers que se unen por complementariedad de bases y delimitan las regiones que se van a replicar.
- Extensión, en cada ciclo de PCR se duplica la secuencia blanco (STR), por lo que en 25 a 30 ciclos teóricamente habrá millones de copias, facilitando su análisis posterior. Actualmente la técnica de PCR en genética forense ha sido mejorada ya que incluye varios pares de primers para amplificar de 15 a 24 marcadores simultáneamente, en la llamada PCR múltiplex, la química de amplificación de los kits comerciales para perfiles genéticos ha mejorado de forma importante, haciéndolos más resistentes a los inhibidores que suelen contener las muestras biológicas de casos forenses, propios del suelo, sangre coagulada, etc.

3.13 Electroforesis Capilar (EC).

Los alelos STR se diferencian por el número de veces que se repite una secuencia corta, esto significa que el tamaño va a ser diferente entre un alelo y otro. Para ver estas diferencias se emplea la EC, donde el producto de PCR de cada muestra se separa a través de un capilar relleno de polímero por acción de un campo eléctrico, proceso que dura alrededor de 30 minutos por muestra. Como parte de la EC, también se detectan los productos para ofrecernos una representación gráfica de la corrida llamada electroferograma. La ventaja de la EC es que por su relación área/volumen, los capilares dispersan eficientemente el calor, lo que permite aplicar voltajes elevados y separar de forma rápida y precisa los fragmentos amplificados⁷.

3.14 Identificación de sospechosos por comparación de perfiles genéticos.

Una vez obtenidos los perfiles genéticos, estos deben ser sometidos a un riguroso proceso de revisión e interpretación. Inicialmente destaca la revisión de controles negativos (sin ADN) y positivos (ADN conocido), para detectar una

posible contaminación y para confirmar que la amplificación por PCR fue correcta. Es conveniente revisar la posible ganancia de alelos (drop-in) o pérdida alélica (drop-out), los cuales son más frecuentes en muestras degradadas o con cantidades mínimas de ADN, lo que ocasiona resultados estocásticos o azarosos que no son reproducibles y no representan el verdadero perfil genético. Una vez verificada la rigurosa observancia de los procesos de gestión de calidad a los que todos los laboratorios de genética forense deben apegarse se realiza una comparación para verificar la concordancia entre perfiles genéticos, y establecer si un individuo inculpado es la fuente u origen de una evidencia biológica encontrada en la escena de un crimen⁹.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO.

4.1 Tipo de investigación.

Bibliográfica: Se realizó una revisión de diversas fuentes bibliográficas, con el fin de recopilar información que orienten a la comprensión de la temática, y de esta forma dar cumplimiento a los objetivos planteados.

Documental: Se llevo a cabo el análisis profundo de documentos, informes y revistas, se seleccionó y depuró la información recopilada, a fin de estructurar el informe final de la investigación, la cual, podrá ser considerada antecedente de futuros proyectos de investigación en el tema.

La investigación bibliográfica se realizó en las siguientes bibliotecas:

- Biblioteca virtual de la Universidad de El Salvador y base de datos perteneciente al sistema bibliotecario universitario.
- Internet:
 - Repositorio institucional de la Universidad de El Salvador.
 - Academia.edu.
 - ScienceDirect.

4.2 Desarrollo.

El proyecto de investigación constó de las siguientes fases:

Fase 1: Investigación bibliográfica sobre el tema, en esta fase se realizó la propuesta del tema y de los objetivos, basándose en la delimitación y justificación la problemática se investigó en diferentes fuentes de información bibliográfica.

Fase 2: Desarrollo del proyecto de investigación, en esta fase se seleccionó toda la información bibliografía se estructuró coherentemente el marco teórico, dando a conocer conceptos e información que sustentan la investigación.

Fase 3: Se presentó el producto final del proyecto de investigación, que consistió en el diseño de una propuesta de práctica de laboratorio, que se espera pueda ser implementada como práctica de laboratorio de la asignatura de Química Forense y Toxicología.

4.3 Propuesta de Practica de Laboratorio.

El producto de esta investigación es la propuesta de una práctica de laboratorio relacionada al análisis del ADN para asignatura de Química Forense y Toxicología, de la Licenciatura en Química y Farmacia, esperando que en un futuro se pueda implementar como parte del manual de laboratorio de la asignatura, para la estructuración de la propuesta, se tomó en cuenta la guía de lineamientos proporcionada para tal fin (ver anexo N° 6), dicha práctica de laboratorio se presenta a continuación en el capítulo V de este informe.

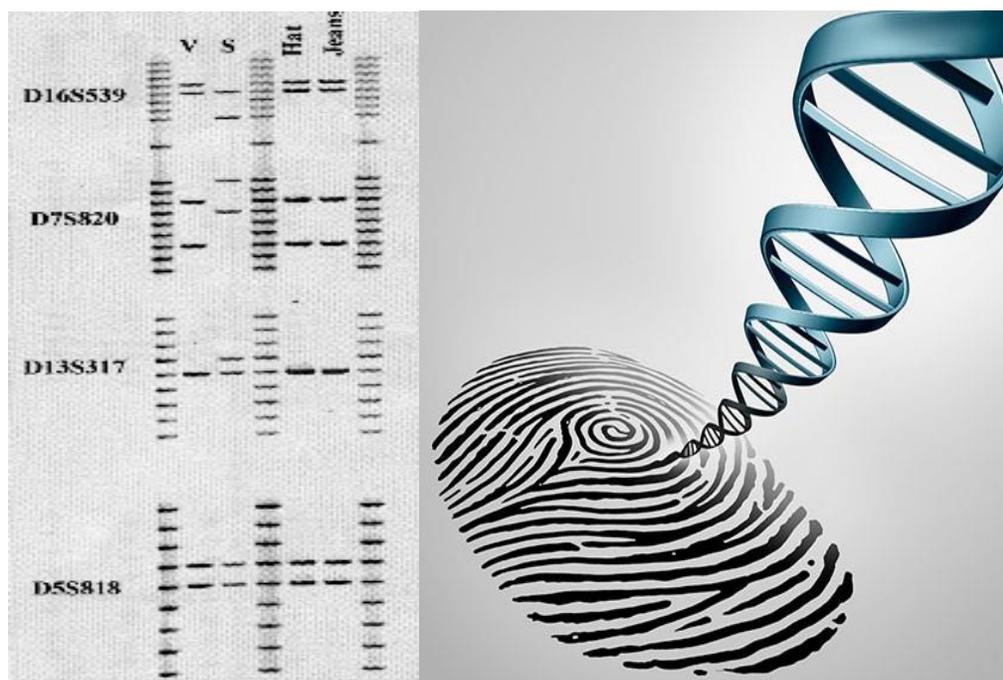
CAPITULO V

5.0 PROPUESTA DE PRACTICA DE LABORATORIO

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ANALISIS DE ADN A PARTIR DE UNA MUESTRA DE SEMEN
COMO EVIDENCIA BIOLOGICA



Objetivos:

- Conocer los fundamentos y los equipos utilizados en el análisis de ADN para la obtención de perfiles genéticos.
- Analizar una evidencia biológica (semen) y obtener un perfil genético a partir del resultado.
- Comparar los resultados genéticos, de acuerdo al tipo de indicio analizado y su procedencia, y determinar la relación entre los resultados obtenidos en el análisis de semen y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual.

Equipos:

- Refrigeradora
- Microcentrífuga para 24 tubos de polipropileno de 1.5mL.
- Baños de María secos.
- Real Time PCR 7,500 de Applied Biosystems®
- Termociclador GeneAmp 97000 System®
- Analizador Genético 3130 de Applied Biosystems®
- Vórtex
- Congelador a -20 °C
- Computadoras

Materiales:

- Micropipetas monocanal o multicanal,
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL estériles.
- Placas con multipocillos
- Pipetas de vidrio graduadas estériles
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta estériles
- Rejilla para microtubos
- Tijeras
- Pizetas
- Marcadores
- Lapiceros
- Guantes de nitrilo

Reactivos:

- Agua ultrapura
- Tris-HCl [10mM]
- EDTA

- NaCl
- Laurilsarcosina
- Proteinasa K
- Ditioneitol
- Fenol
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Kit Quantifiler TM
- Kit Identifiler Plus®
- Size Standar LIZ®
- Formamida

Extracción de ADN a partir del Método de Extracción Diferencial.

Este tipo de extracción inicia con la ruptura de las células epiteliales provenientes de la víctima, esto se consigue incubando la muestra en una solución que contiene dodecilsulfato sódico (SDS) y proteinasa K. El SDS es un detergente tensoactivo iónico que desnaturaliza proteínas rompiendo sus enlaces no covalentes. Los núcleos de las células espermáticas se rompen con una mezcla de SDS, proteinasa K y ditioneitol (DTT). El DTT rompe los puentes disulfuro que conforman las membranas nucleares. La extracción diferencial se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergentes y proteinasa K en ausencia de un agente reductor (como el DTT), por lo que inicialmente se da la rotura de las células epiteliales, sin que se libere el ADN de los espermatozoides. La fase de la extracción del ADN de las células epiteliales sin DTT es la principal diferencia con el método de extracción orgánico convencional. Este tipo de extracción permite obtener finalmente una fracción femenina –ADN de la víctima– y una fracción masculina –ADN del agresor.

Cuantificación -PCR En Tiempo Real.

Es un proceso de síntesis “in vitro” que utiliza como patrón el ADN de la muestra analizada, además de contar con oligonucleótidos sintéticos de unos 15 a 30 nucleótidos que son complementarios de la región que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos conocidos comúnmente como primers actúan como cebadores para la unión de la enzima Taq Polimerasa a la región de interés, esta enzima debe su nombre a la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que posee la capacidad de vivir a temperaturas elevadas de 79 a 85°C, la principal función de este enzima es sintetizar DNA (al que se le denomina DNA complementario (cDNA). Las enzimas polimerasas tienen la función de añadir deoxinucleotidos en una secuencia determinada por una cadena lineal de ADN que sirve de molde, formando pares de bases. El fin de la PCR es aumentar la cantidad de ADN presente en una muestra, por lo que se llevan a cabo una serie de amplificaciones coordinadas en ciclos, cada uno compuesto por tres etapas durante las cuales se someten las muestras a diferentes tiempos y temperaturas de incubación que favorecen distintos procesos.

¿Qué es y cómo funciona un Termociclador?

Un termociclador es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye una temperatura homogénea a través de una placa durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C donde ocurre la desnaturalización, hibridación y extensión de una molécula de ADN. Dado que las reacciones incubadas en el aparato son en soluciones acuosas, suelen incluir en la tapa una placa calentada constantemente a 103 °C para evitar la condensación del agua en las tapas de

los tubos donde ocurre la reacción, y así evitar que los solutos se concentren, lo que modificaría las condiciones óptimas para la enzima polimerizante (Taq Polimerasa) y la termodinámica del apareamiento de los iniciadores conocidos como primers o cebadores.

Amplificación Del cDNA (qRT-PCR).

Una vez que tenemos el cDNA (ADN complementario), queremos amplificar el gen objeto de estudio mediante una PCR cuantitativa. El número de copias que se está obteniendo en cada uno de los ciclos de la PCR puede ser observado y detectado a tiempo real. Esto es gracias al uso de materiales fluorescentes que nos indican la cantidad de copias de DNA que tenemos. Al igual que en una PCR convencional, hacen falta primers (Forward y Reverse), un buffer de trabajo con los cofactores necesarios y dNTPs en exceso, una Taq DNA polimerasa y, generalmente, una sonda específica (TaqMan-MGB) que es la que aporta el componente fluorescente.

Las sondas Taqman-MGB son pequeños oligonucleótidos complementarios a la secuencia comprendida entre los dos primers (AMPLICIÓN), y que llevan unidos dos moléculas químicas. Cada una, en uno de sus dos extremos. En el extremo 5', se sitúa un fluoróforo (Reporter, R) (FAM es uno de los más frecuentes) y en el extremo 3' de la misma sonda, un apagador de esa fluorescencia (Quencher, Q). En la hebra intacta, la distancia entre estas dos moléculas es tal que el quencher apaga la fluorescencia del reporter. Sin embargo, cuando esta sonda está rota (cosa que ocurre por la acción 5'-exonucleasa de la polimerasa), se separan y el reporter emite fluorescencia.

Al igual que ocurre en la PCR convencional, esta qRT-PCR se puede dividir en distintas fases:

- Fase de desnaturalización del cDNA: se separan las dos hebras del cDNA

- Fase de annealing de los primers y de la sonda (que está intacta y no emite fluorescencia)
- Fase de elongación: La Taq polimerasa se une al extremo 3' del primer unido a la hebra de cDNA y empieza a elongar la nueva hebra complementaria, hasta que se encuentra con la sonda TaqMan también unida al cDNA molde. La Taq polimerasa además de replicar, también tiene la función 5' exonucleasa, lo que le permite degradar la sonda, liberando el reporter y produciéndose la emisión fluorescente. El equipo de Real Time PCR tiene un sistema de detección de fluorescencia que registra la emisión de luz en esta fase.

Conocimientos Previos

Para el tema de esta práctica es importante que el estudiante conozca conceptos básicos de química, bioquímica y biología molecular, así mismo conocer de buenas prácticas de laboratorio.

Procedimiento.

Método de extracción diferencial (duración 28 horas). (ver anexo N°4).

Nota: para la preparación de las soluciones a utilizar ver anexo N° 1 y para el Kit de análisis de ADN ver anexo N° 2.

1. Cortar una porción de la muestra a analizar (tela, hisopo, etc.)
2. Colocar la muestra en un tubo de capacidad de 1.5 mL e identificarlo
3. Agregar al tubo los siguientes reactivos:
 - 400 μ L Tris/EDTA/NaCl
 - 25 μ L de Laurilsarcosina al 20%
 - 75 μ L de Agua ultrapura
 - 1 μ L de proteinasa K
4. Homogenizar haciendo uso del vórtex por 10 segundos y posteriormente incubar a 56°C por 24 horas.
5. Proceder a centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
6. Separar de la siguiente manera: sobrenadante colocarlo en otro tubo (previamente identificado como fracción femenina FF) y conservar a 4°C.
7. El precipitado celular hacerle lavados tres lavados de la siguiente manera cada lavado:
 - a. Agregar 500 μ L de la solución amortiguadora para lavado espermatozoide (compuesta por: Tris-HCl 1M pH 8, NaCl 5M, EDTA, SDS en agua ultrapura),
 - b. Luego homogenizar en vórtex y centrifugar a 13,000 rpm, descartar sobrenadante.
8. Al finalizar los tres lavados, al precipitado resultante agregar los siguientes reactivos:
 - a. 150 μ L Tris/EDTA/NaCl + 50 μ L de Laurisarcosina + 7 μ L DTT + 150 μ L de Agua ultrapura + 2 μ L de proteinasa K.
 - b. Mezclar en vórtex por 10 segundos e incubar a 56°C por 2 horas.

- c. Transcurrido las 2 horas, homogenizar en vórtex por 10 segundos y centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos. Luego agregar 400 μ L del solvente fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
9. La fracción femenina (FF) que se tenía conservada, agregarle 400 μ L del solvente fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
10. Mezclar ambos tubos en vórtex hasta visualizar una emulsión lechosa, centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos, posteriormente repetir el proceso de mezclado y centrifugación bajo los mismos parámetros para la fracción femenina.
11. Ensamblar el sistema de centrifugación que contiene: un concentrador y tubo estéril de 1.5 mL para microcentrifugación. Nota: Para uso del Termociclador GeneAmp 97000 (ver anexo N°6).
12. Agregar 100 μ L de agua ultrapura al concentrador, para hidratar la membrana.
13. La fase acuosa de la extracción se debe transferir completamente al concentrador y cerrar la unidad.
14. Luego centrifugar a 500 x g de fuerza centrífuga relativa (RCF) por 10 minutos.
15. Retirar el concentrador y se descartar el filtrado. Nota: Repetir los pasos 14 y 15 hasta terminar de filtrar la fase acuosa del extracto, es decir que se concentra la mayor cantidad de ADN posible en la membrana a través de la centrifugación.
16. Añadir 200 μ L de agua ultrapura al concentrador y tapar, centrifugar a 500 x g RCF por 10 minutos.
17. Retirar el concentrador y se descartar el filtrado, luego agregar 35 μ L de agua ultrapura al concentrador.
18. Identificar un tubo de 1.5 mL y sobre este verter el contenido del concentrador.

19. Proceder a centrifugar el sistema (concentrador invertido y el tubo receptor) a 500 x g RCF por 5 minutos.

20. Descartar el concentrador y pasar a la cuantificación de ADN.

Notas aclaratorias: Los pasos del numeral 11 al 20 realizarlos para cada fracción por separado, teniendo en cuenta el uso de tubos y concentrador debe de ser descartables.

Cuantificación PCR En Tiempo Real

Utilizando el Kit Quantifiler™ Human DNA de Applied Biosystems, realizar los siguientes pasos:

1. Preparación de estándares para cuantificación:
 - a. Identificar 8 tubos de 0.2 mL con el número de patrón de la curva (estándar 1 al 8).
 - b. Agregar la cantidad necesaria de agua ultrapura más el estándar, tal como se indica en la tabla No.1

Tabla No. 1. Estándares para Cuantificación

Estándar (St)	Concentración (ng/ μ L)	Volumen
1	50.000	10 μ L St (200 ng/ μ L)* + 30 μ L de H ₂ O
2	16.700	10 μ L de St 1 + 20 μ L de H ₂ O
3	5.560	10 μ L de St 2 + 20 μ L de H ₂ O
4	1.850	10 μ L de St 3 + 20 μ L de H ₂ O
5	0.620	10 μ L de St 4 + 20 μ L de H ₂ O
6	0.210	10 μ L de St 5 + 20 μ L de H ₂ O
7	0.068	10 μ L de St 6 + 20 μ L de H ₂ O
8	0.023	10 μ L de St 7 + 20 μ L de H ₂ O

* Nota: El estándar es proporcionado en el kit.

2. Preparación de la mezcla de reacción:

E	Std5	Std5	Mx									
F	Std6	Std6	Mx									
G	Std7	Std7	Mx									
H	Std8	Std8	Mx									

Std = Estándar, NTC = Control Negativo, Mx = muestra

6. Posteriormente sellar la placa y se colocar en el REAL TIME PCR 7,500 de Applied Biosystem previamente encendido.
7. Se creará una plantilla ingresando el mapa previamente elaborado en la computadora conectada el equipo, y elegir un ensayo de cuantificación absoluta en el programa SDS v1.2.3

Normalización

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN, serán analizados tomándose en cuenta que el objetivo de la normalización es contar con una cantidad de ADN comprendida entre 0.5 a 1.25 ng en 10 μ L de mezcla.

1. Tomando en cuenta la cantidad de ADN determinada en cada muestra en la cuantificación, añadir la cantidad necesaria de muestra como se muestra el ejemplo de la tabla No. 4.

Tabla No. 4. Cálculo de normalización.

Cantidad de ADN cuantificado ng	Volumen de muestra μ L	Volumen de agua ultrapura μ L	0.5 a 1.25 ng/10 μ L
0.525	2	8	1.05 g/10 μ L

Amplificación.

Utilizando el kit Identifiler Plus® de Applied Biosystems llevar a cabo los siguientes pasos:

1. Calcular la cantidad de reactivo a utilizar, multiplicando el número de muestras a analizar por el volumen de cada reactivo, como se observa en la tabla No.5

Tabla No. 5. Cálculo de reactivos para amplificación.

Reactivo	Volumen μ L	No. de muestras	Volumen total
Reaction Mix	10		
Primer Set	5		
Volumen total	15		

2. Agregar las cantidades calculadas en un tubo de 1.5 mL y mezclar hasta homogenizar.
3. Colocar 15 μ L de la mezcla en cada uno de los pozos a utilizar.
4. Luego añadir 10 μ L de la muestra preparada (debe contener entre 0.5 a 1.25 ng de ADN).
5. El termociclador GeneAmp 97000 System®, se programará con 28 ciclos y 4 etapas de temperatura:
 - 95°C por 11 minutos
 - 94°C por 20 segundos
 - 59°C por 8 minutos
 - 60°C por 10 minutos. Al finalizar los 28 ciclos programar el termociclador para conservar las muestras a 4°C.

Notas aclaratorias: Tomar en cuenta para el numeral 5 el uso del Termociclador GeneAmp 97000 practicaSystem®, (ver anexo N°6). Es importante considerar también la pureza de las muestras. Dependiendo del método de extracción y

purificación del ADN, la muestra puede tener contaminantes que afecten a la digestión enzimática. Los contaminantes son de diferentes tipos. Las proteínas pueden contener nucleasas que degradan al ADN en presencia de iones Mg^{2+} . La presencia de trazas de solventes como el fenol, cloroformo o etanol puede conducir a la desnaturalización de las enzimas. Las sales como CsCl y NaCl pueden disminuir la actividad enzimática. El EDTA puede quelar los iones Mg^{2+} y disminuir la actividad de las enzimas de restricción.

Tipificación por electroforesis capilar.

1. Preparar la solución para la tipificación calculando la cantidad de Size Standard LIZ y formamida de acuerdo a la cantidad de muestras a trabajar, como se observa en la tabla No. 6.

Tabla No. 6. Cálculo de reactivos para amplificación

Reactivo	Volumen μ L	No. de muestras	Volumen total
Standard LIZ	0.3		
Formamida	10		
Volumen total	10.3		

2. Agregar 10 μ L de la solución preparada en cada uno de los pozos en donde se agregarán muestras + 1 μ L de la muestra previamente amplificada.
3. Añadir 1 μ L de la escalera alélica (Allelic Ladder) en las posiciones elegidas para dicho fin.
4. Colocar la placa a tipificar en el termociclador y elegir la opción de desnaturalizar a 95°C por 3 minutos.
5. Poner la placa en una placa refrigeradora manteniendo la temperatura a -20°C , para provocar un shock térmico que mantenga la desnaturalización.

6. Ingresar los datos de las muestras a analizar en la computadora conectada al analizador genético 3130.
7. Los protocolos adecuados se eligen de acuerdo al tipo de tipificación que se desea realizar, para nuestro caso mediante la Reacción en cadena de las polimerasas (PCR)
8. Ubicar la placa en el analizador genético, luego imprimir los electroferogramas y analizarlos.

Nota: El anexo N° 3 ejemplifica las repeticiones en tandem.

Nota aclaratoria final: Las figuras proporcionadas por la UEA Técnicas de Biología Molecular I de la Licenciatura en Biología Molecular, se han colocado para obtener una guía de cómo se deben visualizar el resultado obtenido al finalizar la práctica. En el caso de adaptar la práctica de otra forma en caso de no contar con el kit necesario, tomar en cuenta que probablemente no se obtenga los resultados y/o resultados falsos/positivos.

Análisis de resultados

Describa detalladamente la imagen del gel y determine el tamaño aparente del producto de la PCR (amplicón) obtenido, comparándolo con el marcador de ADN. Ahora compare el tamaño aparente con el tamaño esperado. Discuta las posibilidades si es que obtiene más bandas de las esperadas. Describa lo que observa en el carril del control negativo y discuta las posibilidades si es que obtiene bandas en ese carril.

En las siguientes imágenes se muestran algunos resultados obtenidos en la UEA Técnicas de Biología Molecular I de la Licenciatura en Biología Molecular

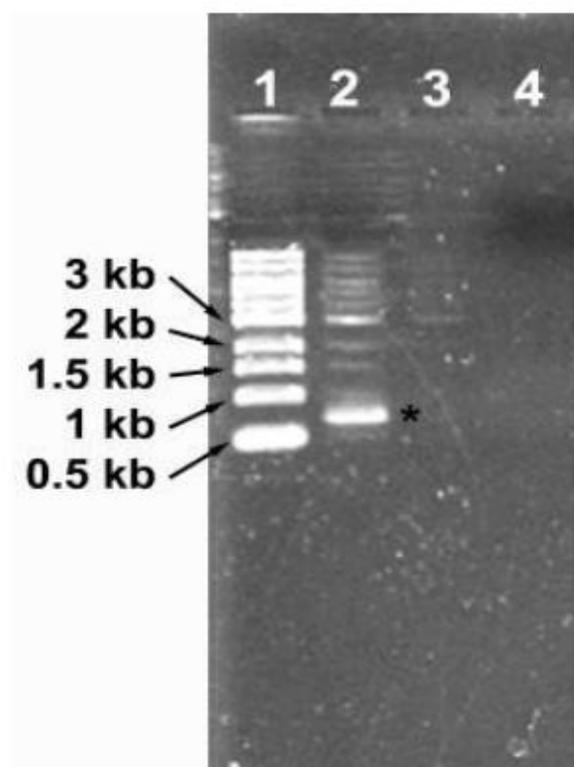


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de un producto de PCR de 687 pb, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de ADN; carril 2, muestra de la reacción de PCR experimental; carril 3, no se cargó muestra; carril 4, muestra de la reacción de PCR control negativo. Durante el cargado del marcador de ADN en el carril 1, los carriles 2 y 3 se contaminaron, por lo que se observa un bandeo que coincide con las bandas del marcador de ADN. El producto de PCR del tamaño esperado se indica con un asterisco.

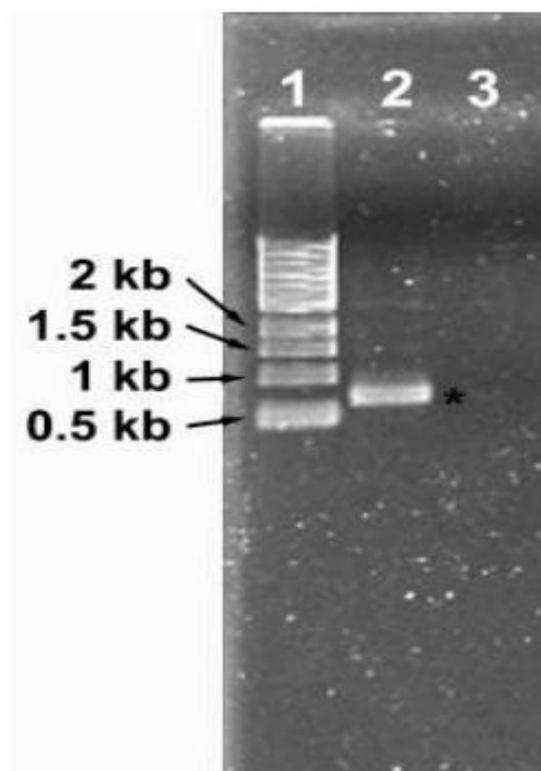


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de un producto de PCR de 687 pb, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de ADN; carril 2, muestra de la reacción de PCR experimental; carril 3, muestra de la reacción de PCR control negativo. En el carril 2 se observa el producto de PCR del tamaño esperado (indicado con un asterisco) y productos de amplificación inespecíficos. La falta de definición de las bandas se debe a que la electroforesis se realizó a alto voltaje y por poco tiempo.

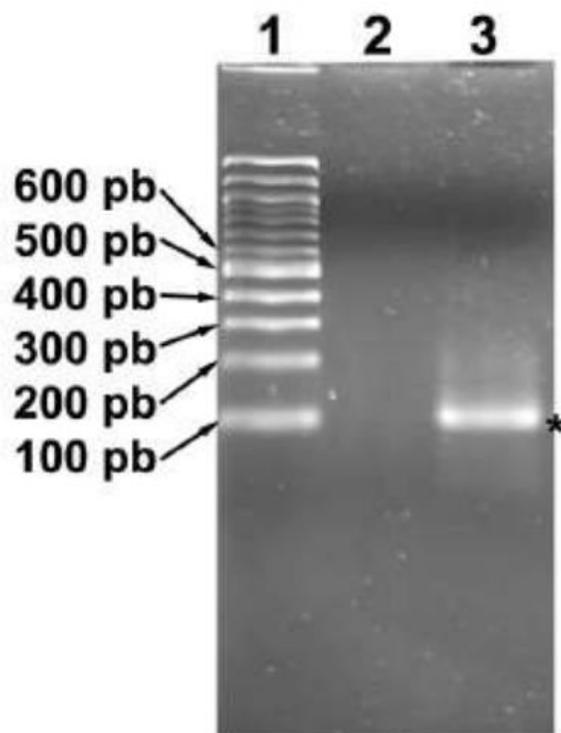


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de un producto de PCR de 103 pb, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de ADN; carril 2, muestra de la reacción de PCR control negativo; carril 3, muestra de la reacción de PCR experimental. En el carril 3 se observa el producto de PCR del tamaño esperado (indicado con un asterisco).

Referencias

1. [Online]. Disponible en:
<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/18966/Apendice.pdf>.
2. [Online]. Disponible en:
https://www.fbbva.es/microsites/ecologia_fluvial/pdf/apendicea.pdf.
3. [Online]. Disponible en:
http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Mol_Buffer_TE_SPA.pdf.
4. [Online]. Disponible en:
https://www.fbbva.es/microsites/ecologia_fluvial/pdf/apendicea.pdf.
5. García Jiménez MA. Asociación de resultados obtenidos en análisis para la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual.
6. [Online]. Disponible en: [https://www.teknova.com/stain-extraction-buffer-w-o-dtt-tris-h \(1\)cl-10-mm-sds-2-nacl-100mm-edta-10-mm-ph-80](https://www.teknova.com/stain-extraction-buffer-w-o-dtt-tris-h(1)cl-10-mm-sds-2-nacl-100mm-edta-10-mm-ph-80).
7. [Online]. Disponible en: [https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22- pr%C3%A1ctica%204_DISE%C3%91O%20EXPERIMENTAL%20Y%20AN%C3%81LISIS%20DE%20DATOS%20EN%20LA%20T%C3%89CNICA%20DE%20LA%20RT%20qPCR%20\(1\).pdf](https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-pr%C3%A1ctica%204_DISE%C3%91O%20EXPERIMENTAL%20Y%20AN%C3%81LISIS%20DE%20DATOS%20EN%20LA%20T%C3%89CNICA%20DE%20LA%20RT%20qPCR%20(1).pdf)
8. [Online]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/47641>

ANEXOS

ANEXO N°1
PREPARACION DE REACTIVOS

Buffer de extracción (Tampón de extracción de manchas sin DTT) (Tris-HCl 10 mM, SDS 2 %, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM), pH 8,0

Formulación:

- Dodecilsulfato de sodio al 2%
- Cloruro de sodio 100 mM
- Tris-HCl 10 mM, pH 8,0
- EDTA 10 mM

Buffer 10mM Tris/1.0 mM EDTA a pH=8.0 + 2 M NaCl: Se pesa 1.2114g de Tris (Tris(hidroximetil)aminometano), base, 0.2923 g de EDTA y 116.88 g de NaCl y se disuelven en 900mL de agua desionizada. Posteriormente se ajusta el pH a 8 con unas gotas de HCl. Cuando la solución tiene el pH indicado se afora a un litro con agua desionizada, luego filtrar a 0.45 μ m y se desgasifica.

Solución PCI (Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico) (25:24:1) para 250mL

-Preparar la mezcla en una campana de gases, con guantes. La solución PCI es inflamable y el fenol y el cloroformo son potencialmente cancerígenos. La solución se prepara en una botella estéril de vidrio Pyrex.

- Añadir 5 mL de alcohol isoamílico
- Añadir 120mL de cloroformo
- Añadir 125mL de fenol
- Posteriormente mezclar bien
- Cubrir la botella con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz.
- Almacenar a 4 °C.

Solución amortiguadora TE-4 1x

Preparación de Buffer Tris 10 mM-EDTA 1mM (TE 10:1)

El buffer TE 10:1 es una solución amortiguadora del pH comúnmente empleada en biología molecular, especialmente para procedimientos que buscan proteger al DNA o RNA. La capacidad amortiguadora del buffer depende del Tris, mientras que el EDTA es el responsable de proteger a los ácidos nucleicos inactivando a las DNAsas o RNAsas. El EDTA logra esta inactivación actuando como quelante de cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} los cuales son indispensables para el funcionamiento de las enzimas citadas. El pH del buffer es ajustado con HCl dependiendo del tipo de ácido nucleico que se quiera proteger, siendo el óptimo para RNA de 7.5 mientras que para el DNA es de 8.0.

1. Prepare 100 mL de Ácido Clorhídrico 1M (1M HCl) agregando 8.62 mL de HCl concentrado a 91 mL de dH₂O previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 mL. (No agregar el agua al ácido). Mezcle en una plancha agitadora magnética durante 5 minutos. Afore a 100 mL con dH₂O.
2. Prepare 100 mL de Hidróxido de Sodio 10M (10M NaOH) agregando 40 g de NaOH a 40 mL de dH₂O previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 mL. Mezcle con una barra magnética en una plancha agitadora hasta que el NaOH se haya disuelto por completo. Afore a 100 mL con dH₂O. ¡Precaución, esta reacción es exotérmica!
3. Prepare 1 litro de solución 1M Tris HCl disolviendo 121 grs de Tris Base en 800 mL de dH₂O. Ajuste la solución así formada a un pH de 8.0 con 1M HCl agregándolo gota a gota con una pipeta Pasteur limpia y afore a 1 litro. Esta solución se puede esterilizar por filtración a través de unidades de filtración equipadas con membrana de acetato de celulosa de 0.2 μm . Consérvese refrigerada entre 4 y 8°C.
4. Prepare 1 litro de solución 0.5M EDTA pH 8.0 disolviendo 186.1g de Na₂EDTA-2H₂O en 700 ml de dH₂O. Ajuste el pH a 8.0 con 10M NaOH (~50 ml) y afore con dH₂O a un litro

5. Prepare la cantidad necesaria de TE 10:1 1X de acuerdo a la tabla de preparación (ver abajo). Disponga el 80% del volumen requerido de dH₂O en un vaso de precipitados y agregue el volumen requerido de cada uno de los dos componentes.
6. Mezcle en una plancha de agitación magnética durante al menos 5 minutos. Ajuste el pH de la solución a 8.0 añadiendo 1M HCl gota a gota con una pipeta de transferencia limpia y afore al volumen final con dH₂O.

Tabla No.1. Volumen necesario de TrisHCl y EDTA según se requiera de 5mL a 1000 mL para la preparación total de la solución amortiguadora TE-4 1x

	Cf 1X	5ml	10ml	50ml	100ml	250ml	500ml	1000ml
1M TrisHCl	10 mM	50 μ l	100 μ l	500 μ l	1 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml
0.5M EDTA	1 mM	10 μ l	20 μ l	100 μ l	0.2 ml	0.5 ml	1 ml	2 ml
dH ₂ O		4.94 ml	9.88 ml	49.4 ml	98.8 ml	247 ml	494 ml	988 ml

Notas:

1. El Tris(hidroximetil)aminometano también es conocido por los nombres de tris, TRIS, tris base, trizma, trisamina, THAM, trometamina, trometamol y trometano. Tris-HCl hace referencia a la solución de tris cuyo pH ha sido modificado con HCl. El pH de las soluciones amortiguadoras a base de Tris cambia significativamente con la temperatura, disminuyendo aproximadamente 0.028 unidades de por cada °C por encima de los 25°C. Por ello es necesario ajustar el pH ante fluctuaciones extremas de temperatura ambiental. Como el pKa del Tris es de 8.08, este no debe usarse para soluciones amortiguadoras con rangos operacionales por debajo de pH 7.0 o por encima de pH 9.0.
2. Aunque generalmente no es necesario, la solución TE 10:1 puede ser esterilizada en autoclave o por filtración a través de membranas de acetato de celulosa de 0.2 μ m.

3. En caso de que se formase algún precipitado, la solución puede resuspenderse calentándola a 37°C.
4. Agua desionizada equivale a H₂O

Proteinasa K (Solución de Proteinasa K)

- Disolver 20 mg de proteinasa Ken 1 mL de agua ultrapura
- Filtrar a través de un filtro estéril de 0.2 μm de poro y colocar en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.
- Congelar a -20°C.

ANEXO N° 2
KIT Y EQUIPOS PARA ANALISIS DE ADN



Figura N°1. Kit Quantifiler TM.



Figura N°2. Kit Identifier Plus®.



Figura N° 3. Size Standard LIZ®



Figura N° 4. Analizador Genético 3130 de Applied Biosystems®



Figura N° 5. Real Time PCR 7,500 de Applied Biosystems®



Figura N° 6. Termociclador GeneAmp 97000 System®

ANEXO N° 3.

Ejemplo de repeticiones en tándem

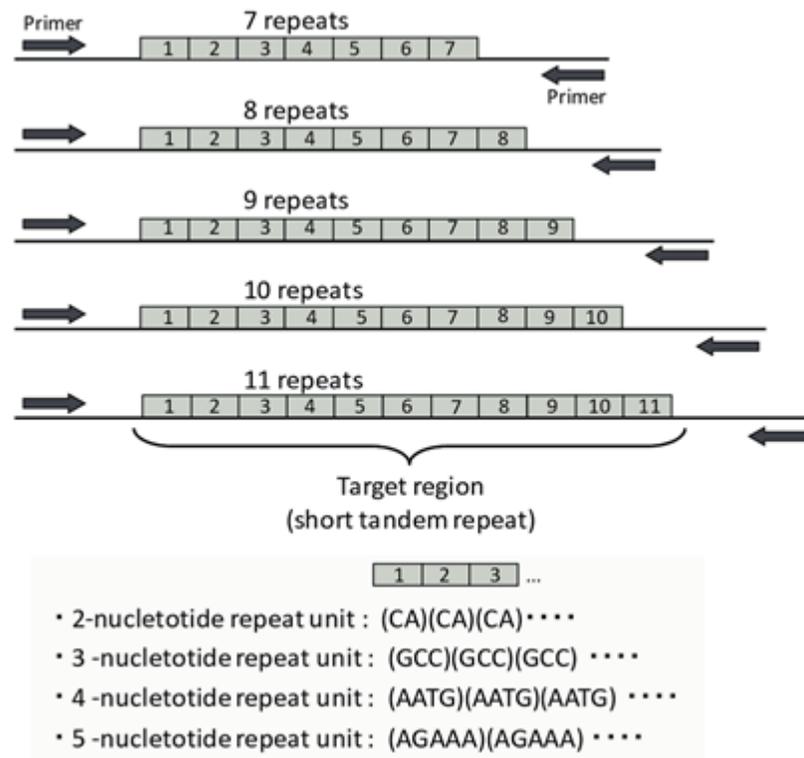


Figura N° 7. Ejemplo de repeticiones de nucleótidos.

ANEXO N° 4.

Esquema general del principio CE

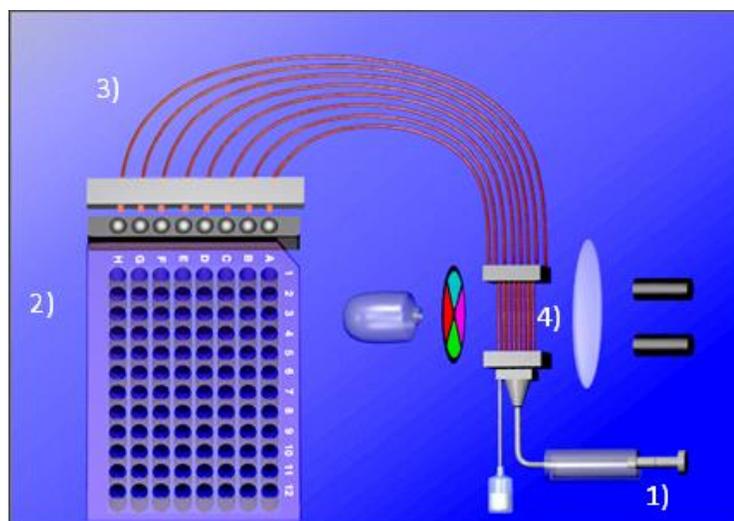


Figura N° 8. Esquema general del principio CE en el secuenciador CEQ™ 8000 (Beckman Coulter). 1) Cartucho de gel – que contiene el polímero utilizado para la separación, 2) Placa de 96 pocillos con muestras, 3) Ocho capilares en los que se cargan automáticamente las muestras y se realiza la CE, 4) Sistema óptico de ventanas para la detección de picos⁸.

ANEXO N° 5.

Esquema del método de extracción diferencial.

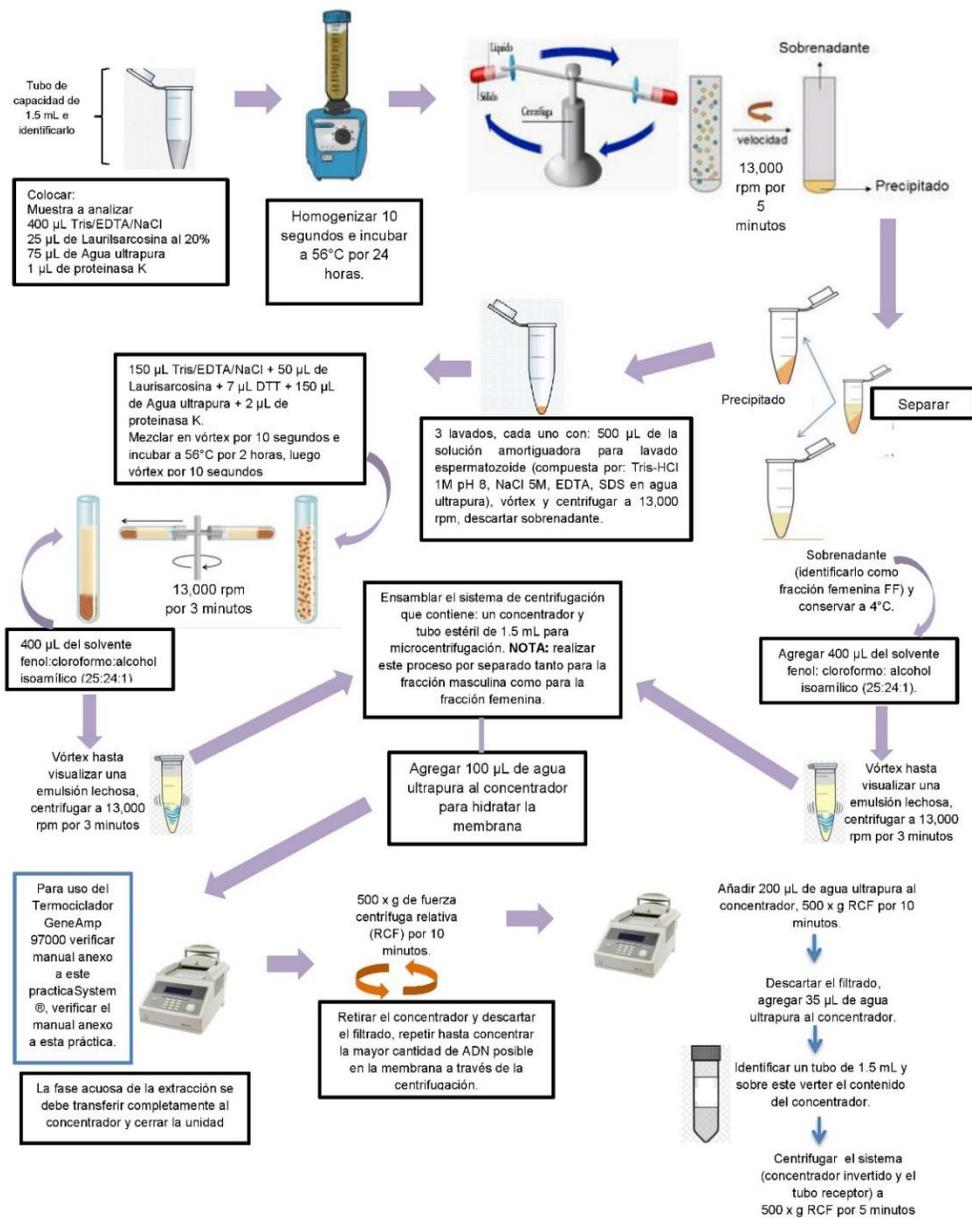
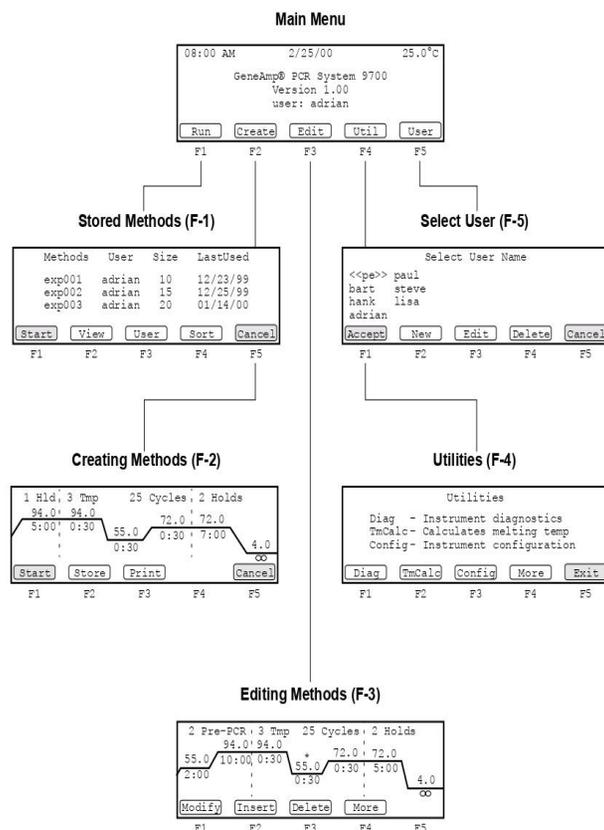


Figura N° 9. Procedimiento del método de extracción diferencial.

ANEXO N° 6
GUIA DE CONSULTA RÁPIDA PARA USO DE TERMOCICLADOR

Acceso a las funciones desde el menú principal



Copyright © 2000 PE Corporation
 MicroAmp es una marca registrada de PE Corporation. BigDye, PE, PE Biosystems y PE Applied Biosystems son marcas comerciales.
 AmpliCycler, AmpliTaq Gold, y GeneAmp son marcas registradas de Roche Molecular Systems, Inc.

P/N 4903616B

Sistema (PCR) 9700 GeneAmp®

Guía de consulta rápida

Preparación e inicio de una reacción

- Procedimiento**
- ◆ Prepare las muestras en los tubos desechables MicroAmp® PCR.
 - ◆ Coloque los tubos desechables en los pocillos del instrumento y cierre la tapa.
 - ◆ Seleccione un método.
 - ◆ Inicie la reacción.

Comandos y funciones Use las teclas de función variable (teclas F), las flechas y el teclado numérico ubicado debajo de la pantalla para ejecutar los comandos y funciones, para desplazarse y para introducir los datos.

Para ejecutar las funciones que se muestran a lo largo de la parte inferior de la pantalla, presione la tecla F correspondiente ubicada debajo de la pantalla.

Nota La pantalla del Sistema GeneAmp 9700 no es del tipo táctil.

Selección de métodos En el menú principal, presione **Run** (Ejecutar). Aparecerá la pantalla de métodos almacenados (Stored Methods). Elija un método. El GeneAmp 9700 contiene seis métodos pre-programados:

- ◆ AmpliCycler Sequencing
- ◆ AmpliTaq Gold®
- ◆ BigDye™
- ◆ LMS2
- ◆ Touchdown PCR
- ◆ XL PCR

Si lo desea puede modificar estos métodos o crear métodos nuevos y almacenarlos junto con los métodos incorporados.

Presentación en pantalla de los parámetros de métodos

En la pantalla Stored Methods, presione **View** (Ver). Después de revisar los parámetros pre-PCR, PCR y post-PCR de un método almacenado, presione **Start** (Iniciar) para ejecutar el método o presione **Return** (Volver) para volver a la pantalla Stored Methods.

	<p>Clasificación de los métodos</p> <p>En la pantalla Stored Methods, presione Sort (Ordenar). Los métodos pueden ordenarse alfabéticamente, por la última fecha de utilización, por fecha de almacenamiento o por tamaño.</p>	
Ejecución de los métodos	<p>En el menú principal (Main), presione Run. Elija un método. Presione Start (Iniciar). En la pantalla Stored Methods, presione Start para iniciar la reacción.</p> <p>En cualquier momento de una reacción, puede hacer una pausa de hasta 10 minutos presionando Pause. Presione Resume (Reanudar) para continuar el método antes de transcurridos los 10 minutos.</p> <p>Para detener una reacción en cualquier momento, presione la tecla Stop (Detener) en el teclado. La reacción se detiene por un tiempo y luego se cancela el proceso. La reacción puede reanudarse durante este período de pausa presionando Resume.</p> <p>Nota Para ver la pantalla de información del método (Method Information), presione Info en cualquier momento durante una reacción.</p>	<p>Creación de métodos</p> <p>En el menú principal (Main), presione Create. Para definir un método, en la nueva pantalla especifique Time (Tiempo), Temperature (Temperatura) y Cycle Number (No. de ciclos) para:</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Incubación(s) pre-PCR — Tiempo/Temperatura ◆ PCR — Tiempo/Temperaturas/Ciclos ◆ Incubación(s) post-PCR — Tiempo/Temperatura <p>Desde un segmento PCR, presione More para definir parámetros adicionales.</p> <p>En la pantalla Create, presione Store para nombrar y almacenar el nuevo método.</p> <p>Modificación de AutoExtension y Ramp Rate</p> <p>Cuando esté en un segmento de la etapa PCR, presione More para acceder a Modify (Modificar) y las selecciones subsiguientes de autoextensión y velocidad de rampa.</p>
Modificación de los métodos	<p>Nota En el menú Main, presione Edit (Modificar) para cambiar los parámetros de un método determinado.</p> <p>Inserción de segmentos y ciclos</p> <p>Seleccione un segmento de tiempo o temperatura. Presione More (Más) para acceder a la función de inserción. Presione Insert (Insertar).</p> <p>Presione Hold (Espera) para insertar un nuevo segmento o presione Cycle para insertar un ciclo.</p> <p>Creación de pausas</p> <p>En la pantalla Create (Crear), use las flechas en la tecla circular para seleccionar un segmento de tiempo o temperatura del método PCR donde se desee introducir una pausa programada. Presione More. Presione Insert. Aparecerá la pantalla Insert.</p> <p>Designación y almacenamiento de métodos</p> <p>Desde la pantalla Create estando en la etapa PCR del método, presione Store (Almacenar). Para aceptar el nombre predeterminado, presione Accept (Aceptar). Presione Method (Método) para indicar el nombre deseado para el método. Presione Accept para almacenar el método con el nombre especificado.</p> <p>Nota Los métodos pueden almacenarse por nombre de usuario o por nombre de método.</p>	<p>Protección de los métodos</p> <p>Si lo desea puede asignar un número personal de identificación (PIN#) a un método con el fin de evitar que otros usuarios sobrescriban o eliminen un método inadvertidamente. Después de introducir o modificar un nombre de usuario, presione PIN# para mostrar la pantalla New PIN Number (Nuevo número PIN). Escriba el número PIN de cuatro dígitos. Presione Enter (Entrar). Presione Lock (Bloq) para alternar entre el estado bloqueado y no bloqueado.</p>
		<p>Eliminación de métodos</p> <p>En la pantalla Utilities (Herramientas), presione More. En la nueva pantalla, presione Delete (Eliminar) para mostrar la pantalla Methods. Se requiere un número PIN para eliminar un método protegido.</p>
		<p>Adición o modificación de usuarios</p> <p>En el menú Main, presione User (Usuario) para abrir la pantalla Select User Name (Seleccionar nombre de usuario). Presione New (Nuevo) para agregar un nombre nuevo a la lista.</p>
		<p>Historia de una reacción</p> <p>En la pantalla Utilities, presione More, seguido por Hist (Historia) para leer un registro de los sucesos y errores ocurridos durante una reacción.</p> <p>Alternativamente, a este registro puede accederse una vez finalizada o cancelada una reacción, ya que la función Hist aparece en la pantalla End of Run (Final de la reacción).</p>

continúa en la siguiente página

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los avances científicos han permitido el estudio del ADN, siendo este de gran importancia en las ciencias forenses, esto favorece el estudio de indicios biológicos mínimos, la amplificación por PCR permite analizar muestras pequeñas, lo cual es importante en investigaciones criminales, ya que no siempre se cuenta con cantidades grandes de muestras.
2. Se logró detallar el análisis de ADN para la identificación de sospechosos, el análisis de ADN genera un perfil genético, el estudio del ADN ayuda en la identificación de individuos, en casos de agresión sexual el semen es uno de los fluidos que un agresor por descuido puede dejar en la escena del delito, por lo tanto, el semen se vuelve una de las evidencias más importantes para analizar en investigaciones criminales de este tipo
3. La investigación llevada a cabo, permitió presentar una propuesta de práctica de laboratorio, esto como resultado de la información recopilada de las diferentes fuentes bibliográficas, documentos y revista, con el fin que pueda ser aplicada en los laboratorios de la asignatura de Química Forense y Toxicología.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. A las autoridades de la Facultad de Química y Farmacias, pueden tomar a consideración la gestión de la adquisición de los equipos propuestos en la práctica de laboratorio, a fin de implementar dicha práctica como parte del programa de la asignatura.
2. A los estudiantes que realicen la práctica de laboratorio tener en cuenta que en los casos en los que haya que manipular las evidencias biológicas, se debe hacer en condiciones extremadamente limpias o de ser posible estériles para evitar la contaminación de las, almacenarlos de forma individual e identificado los de manera adecuada.
3. A los docentes de la asignatura de Química Forense y Toxicología, pueden llevar a cabo la adaptación de la práctica de laboratorio propuesta a fin de adecuarla a las condiciones del laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia, así mismo deben considerar los tiempos de análisis según sus horas de laboratorio.
4. Para futuras investigaciones considerar bibliografía reciente, ya que este es un tema que va a la vanguardia, cada vez la tecnología avanza por lo que los aportes científicos progresan lo cual ayudaría a seguir enriqueciendo las investigaciones futuras del tema.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez ROC, Mallea. WGS. Medicina Legal y Forense. 1st ed. Fuentes CEC, editor. La Paz; 2013.
2. Calabuig G, Villanueva Cañadas. Medicina Legal y Toxicología. 6th ed. Madrid; 2004.
3. Corte Suprema de Justicia de El Salvador. [Online]; 2022. Disponible en: (<http://medicinalegal.csj.gob.sv/index.php/organizacion/dependencias/departamento-de-biologia-forense>).
4. Cornago Ramírez MDP, Santos SE. Quimica Forense Madrid; 2016.
5. Piro OE. Breve Historia del ADN, Su Estructura y Función; 2012
6. Fernández Piqueras J. Polimorfismos en el ADN humano. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
7. Villalobos Rogel DH. Las Pruebas de ADN en el Contexto Forense. Ciencias Forenses de Honduras. 2018.
8. Alonso Alonso A. ADN forense, investigación criminal y búsqueda de desaparecidos. Ciencia al Alcance de la Mano. 2011.
9. López Reyes E. Estudio de ADN en Semen. Revista de Formación Profesional. 2014.
10. ResearchGate GmbH. [Online]; Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-Short-Tandem-Repeat-STR_fig2_221912832

ANEXOS

ANEXO N° 1.

Estructura del espermatozoide

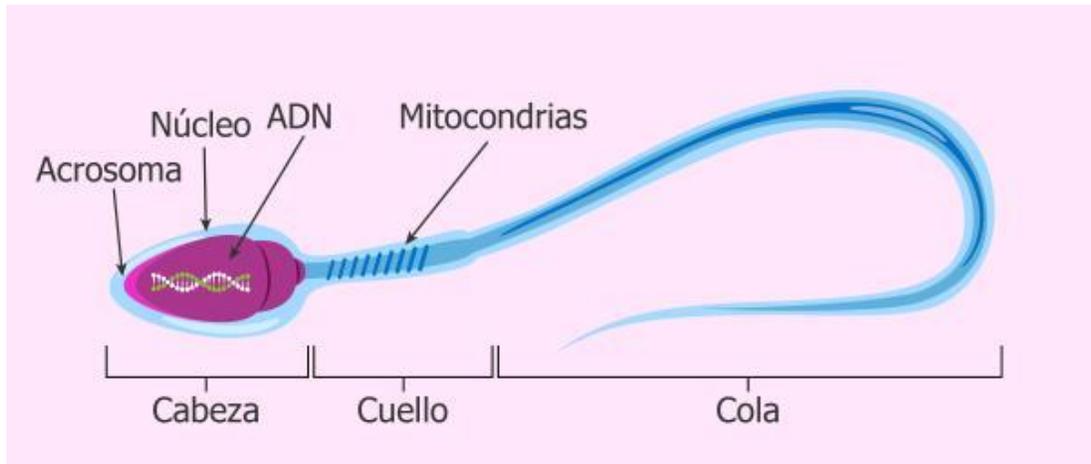


Figura N° 5. Estructura de un espermatozoide⁴.

ANEXO N° 2.

Modelo original en escala de Watson y Crick de la molécula de ADN.

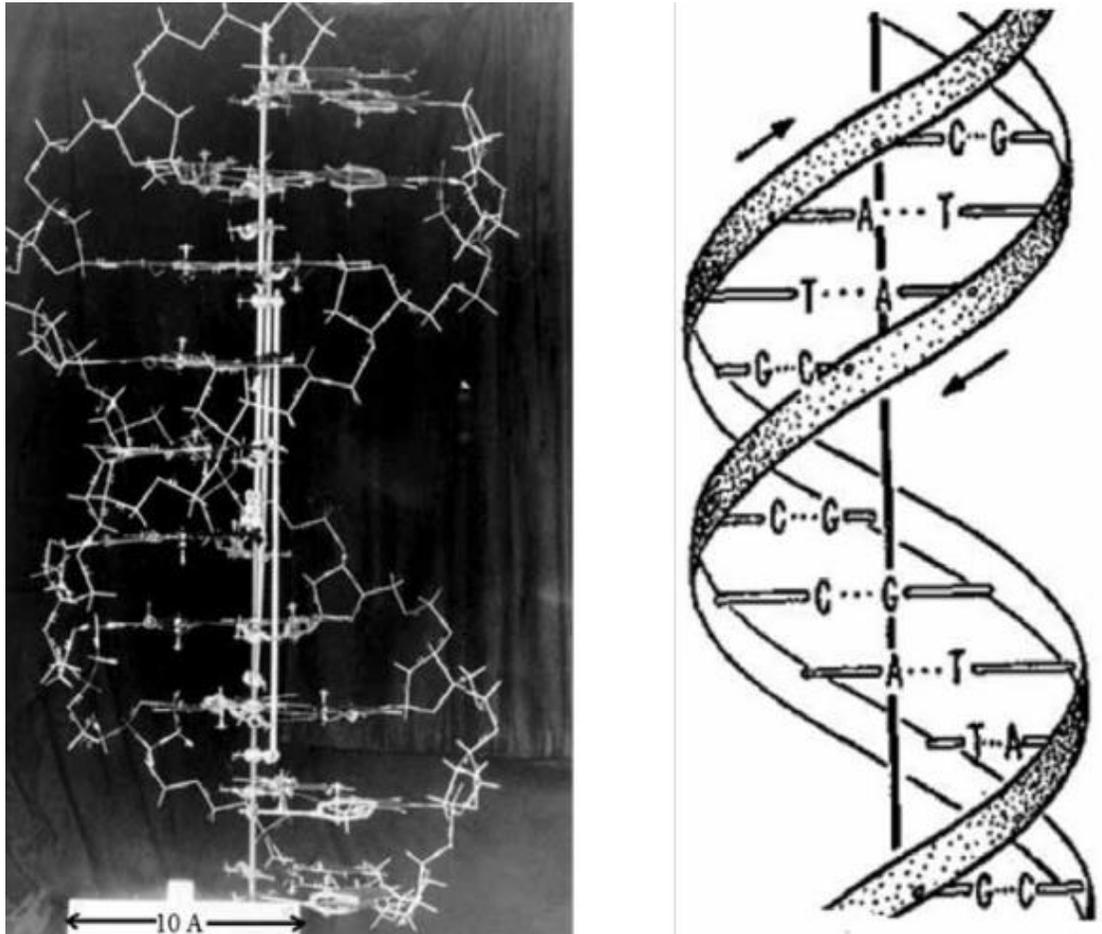


Figura N° 6. Izquierda: Modelo original en escala de Watson y Crick de la molécula de ADN-B (hecho de alambres y chapas, derecha: esquema original del ADN (adaptado de Watson & Crick, 1953) ⁵.

ANEXO N° 3.
La doble hélice del ADN

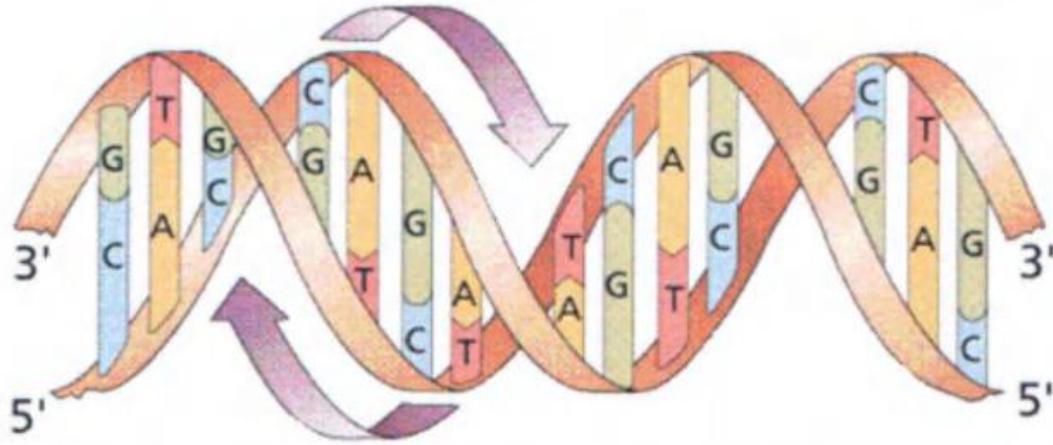
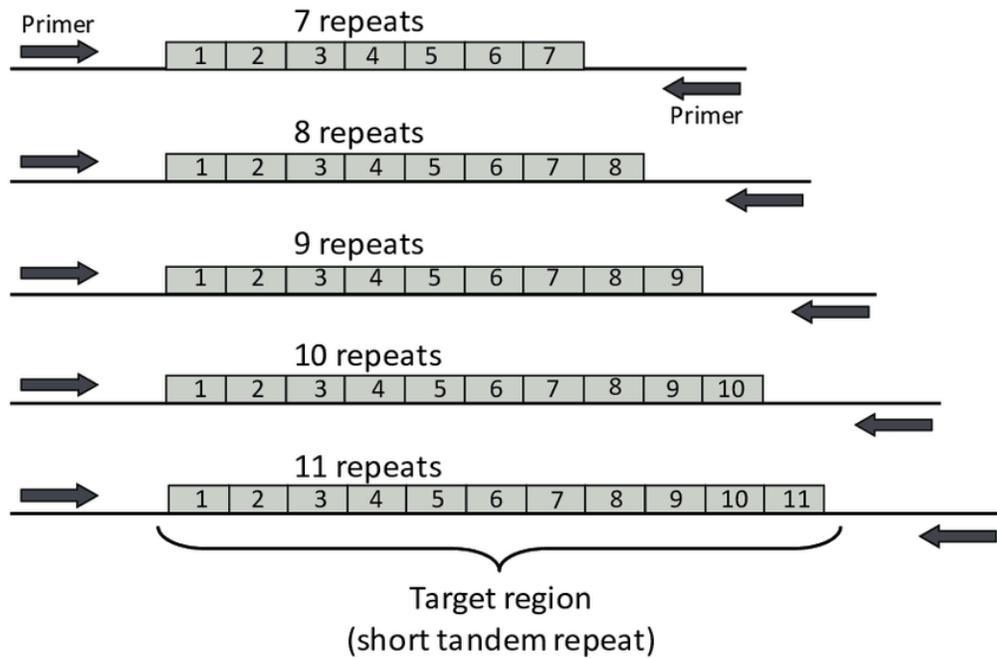


Figura N° 7. La doble hélice del ADN y su disposición antiparalela⁴.

ANEXO N° 4.

Ejemplo de repeticiones en tándem



1 2 3 ...

- 2-nucleotide repeat unit : (CA)(CA)(CA).....
- 3 -nucleotide repeat unit : (GCC)(GCC)(GCC)
- 4 -nucleotide repeat unit : (AATG)(AATG)(AATG)
- 5 -nucleotide repeat unit : (AGAAA)(AGAAA)

Figura N° 8. Ejemplo de repeticiones de nucleótidos¹⁰.

ANEXO N° 5.

Amplificación exponencial de una secuencia de interés mediante PCR

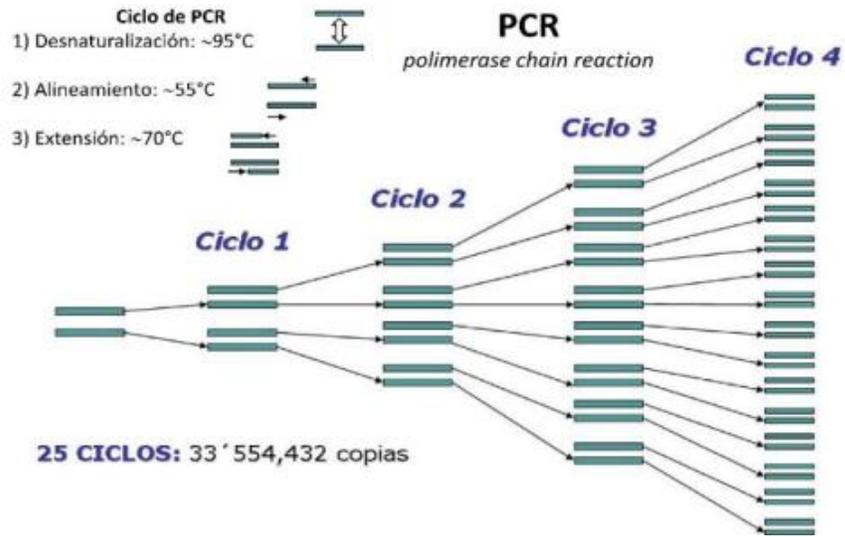


Figura N° 9. Amplificación exponencial de una secuencia de interés mediante PCR. Se esquematizan a la izquierda las etapas de cada ciclo de PCR⁷.

**RESENTACIÓN DEL DOCUMENTO ESCRITO DE LA PRÁCTICA DE
LABORATORIO.**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**CURSO DE ESPECIALIZACIÓN
“ANÁLISIS QUÍMICO APLICADO A LA INVESTIGACIÓN CRIMINAL”
ESTRUCTURA DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO**

El presente documento establece el contenido a ser considerado para la estructuración de la propuesta de práctica de laboratorio, que presentarán los egresados al concluir el Curso de Especialización y contendrá los siguientes apartados:

Portada:

Nombre de la Facultad (Centrado)
Nombre de la Práctica (Centrado)
Imagen alusiva a la temática (Centrado)

Objetivos:

Establecer un mínimo de tres Objetivos, no es necesario diferenciar entre objetivo general y específicos.

Fundamento Teórico:

Deberá incluirse el fundamento químico, puede incluirse reacciones químicas que ayuden a la comprensión del tema.

Equipo, Materiales y Reactivos:

Debe desglosarse cada uno de estos requerimientos para el desarrollo de la práctica.

En cuanto del equipo deben ser incluidas las especificaciones.

Los materiales deben ser detallados, de igual manera se deberán incluir las especificaciones.

Los reactivos, deben detallarse los que se utilizarán en estado puro y los preparados, incluyendo información como concentraciones, en caso de ser necesario.

Conocimientos Previos:

Plasmar cualquier conocimiento previo que sea necesario para que el estudiante comprenda de manera íntegra la práctica que va a desarrollar y que no se contempla en el fundamento teórico.

Procedimiento:

Deberá ser presentado paso a paso de manera secuencial, podrá incluir un esquema que permita visualizar mejor el proceso.

Referencias Bibliográficas:

De acuerdo a Normas VANCOUVER

Anexos:

Principalmente los que complementen al apartado de Equipo, Materiales y Reactivos; para este último se deberá incluir la forma de preparación de aquellos que no se utilicen en forma pura.