

Resumen elaborado para el “Programa de Ayudas del GHEP-ISFG para asistencia a Jornadas anuales de Genética Forense”.

Autor: Germán Burgos Figueroa, Docente-Investigador Universidad de Las Américas, Laboratorios de Investigación, Quito (Ecuador)

TITULO: DETERMINACIÓN MOLECULAR DE SEXO MEDIANTE LAMP

RESUMEN

La determinación del sexo en muestras biológicas humanas es de gran utilidad para las ciencias forenses, en particular en contextos como desastres masivos, personas desaparecidas y casos de agresión sexual. Existen métodos comercialmente disponibles para la detección de trazas masculinas que van desde métodos inmunocromatográficos para detección de antígenos (por ejemplo, P30, semelogenina) pasando por formatos de amplificación por PCR resuelta por agarosa o electroforesis capilar, llegando a los métodos más sofisticados que constituyen el gold estándar como los basados en PCR en tiempo real.

Generalmente las pruebas de ADN se dirigen hacia el gen de Amelogenina pese a que se han informado algunas inconsistencias en su desempeño; por lo tanto, la alternativa de encontrar nuevos marcadores adicionales específicos del cromosoma Y, ha adquirido relevancia en la actualidad.

Los kits comerciales de tipificación de ADN disponibles para PCR en tiempo real tienen alta precisión y fidelidad; sin embargo, requieren equipos sofisticados y costosos que hacen que esta alternativa dependa de la tenencia de estos equipos, no siempre disponibles en laboratorios de baja complejidad.

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP: Loop-Mediated DNA Amplification) es una técnica de amplificación de ADN versátil, con mayor eficiencia, especificidad y rendimiento respecto a la PCR convencional. El procedimiento en sí mismo es simple desde el punto de vista experimental ya que se trata de una reacción isotérmica mediada por la ADN polimerasa Bst que permite la síntesis continua de copias de ADN mediante auto desplazamiento de cadena, lo que aumenta su sensibilidad y evita la necesidad de equipos que realicen ciclos temperados. La alta especificidad de este método se basa en el uso de 4 a 6 cebadores que abarcan más de 8 regiones distintas en un gen objetivo. Los productos de amplificación pueden detectarse mediante electroforesis en agarosa, análisis de turbidez, así como a simple vista, utilizando colorantes sensibles al pH.

En este trabajo, describimos el diseño y la optimización de un protocolo LAMP múltiplex para la detección de marcadores específicos del cromosoma Y humano. Nuestro sistema utiliza un conjunto de 6 cebadores para cada objetivo, diseñado para mejorar la sensibilidad y especificidad, reduciendo el tiempo de detección a solo 45 minutos. Además, la detección de los diferentes objetivos en el cromosoma Y, ya sea individualmente o en combinación, reveló resultados específicos. La sensibilidad del ensayo se determinó con una mezcla de ADN humano femenino y masculino que simulaban muestras forenses en diferentes proporciones. Los conjuntos de cebadores individuales mostraron una alta sensibilidad en concentraciones de ADN masculino que

oscilaron entre 58,6 y 3,7 pg/uL. Cuando se utilizaron varios conjuntos de cebadores para diferentes objetivos combinados (Multiplex LAMP) la sensibilidad arrojó una detección de hasta 0,1 pg/uL de ADN masculino, lo que hace éste ensayo 10 veces más sensible que los kits de cuantificación de qPCR-DNA. Finalmente, se observó una alta especificidad cuando se probó contra 6 especies domésticas comúnmente encontradas en contextos forenses.