



**XXVII Jornadas**  
30 de Agosto del 2022

**PROPUESTA COMISIÓN DE TRABAJO:**

**DETERMINACIÓN MOLECULAR DE SEXO MEDIANTE AMPLIFICACIÓN  
ISOTÉRMICA BASADA EN LAMP**



Germán Burgos Figueroa



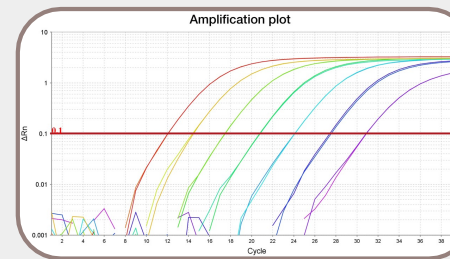
INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN

# Investigación forense

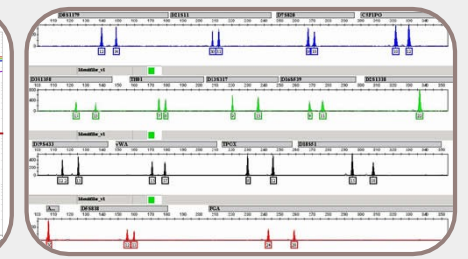


Detección de fluidos corporales

## Varios análisis



qPCR



Perfiles genéticos

Determinación del sexo humano:

- Desastres masivos
- Personas desaparecidas
- **Delitos sexuales**



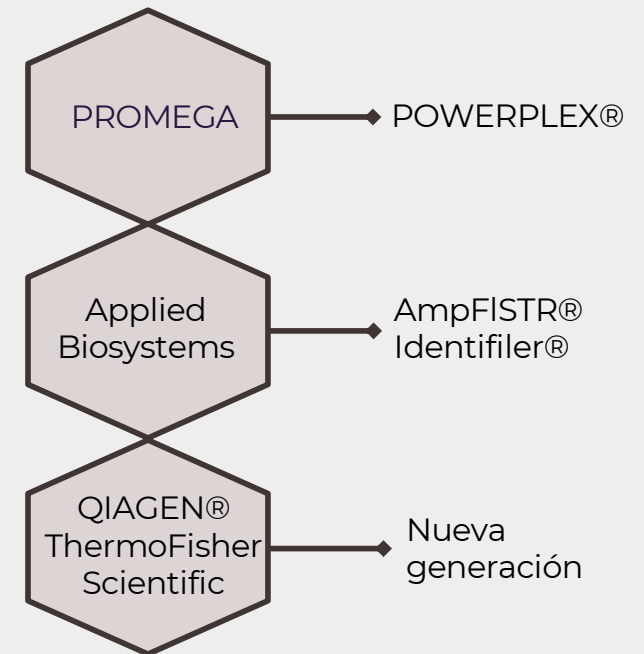
# Identificación de ADN masculino

## Técnicas inmunocromatográficas

Detección de antígenos propios de varones



## Kits

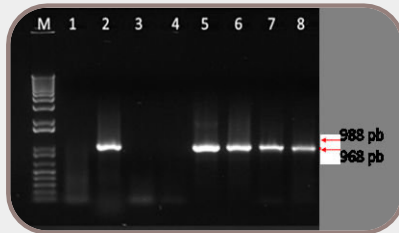


# Identificación de ADN masculino

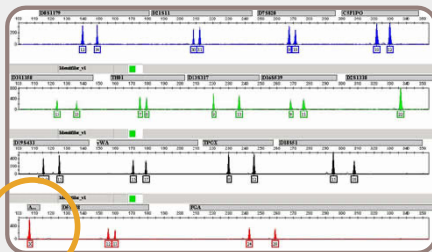


## PCR convencional

- Electroforesis en gel de agarosa



- Electroforesis capilar



**Amelogenina (algunas deficiencias)**



## Marcadores alternativos

- Regiones alfoides
- TSPY
- DYZ1 (Secuencias satélites)

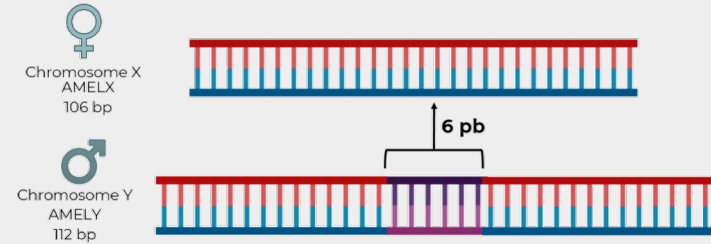
# Deficiencias del gen de la Amelogenina

**Table 2** Global scenario of Y deletion and its characteristics involving different populations

Population	Sample size	AMELY deletion frequency (%)	References
Chinese (North)	79,304	0.0227	[77]
Chinese (South)	8,087	0.037	[93]
Singapore	567	0.705	[127]
Malaysian (mixed)	338	3.6 (Indian) 0.88 (Malay)	[21]
Caucasian	327	0.3058	[106]
Indian	4257	0.23	[60]
Austrain	29,432	0.018	[109]
Indian	270	1.85	[113]
Australian	109,000	0.02	[85]
Nepalese	77	6.49	[18]
Sri Lankan	24	8	[102]
Israeli	96	1.04	[83]
Italian	13,000	0.008	[72]
Chinese	10,526	0.019	[123]
Japanese	500	0.2	[112]

Ensayo estándar

Gen de la Amelogenina



Deleciones en regions del ChrY

Delección alélica de AMELY

# Rendimiento mejorado



Rara  
presencia de  
deleciones

Coamplificación con  
otros marcadores del  
cromosoma Y

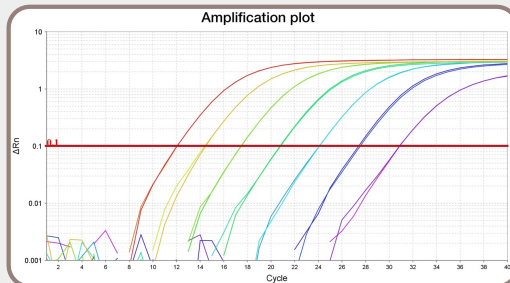
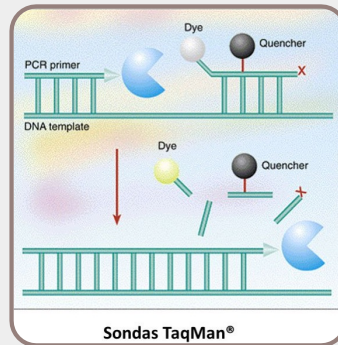
Mezcla de  
cebadores

**Primer mix**

TSPY3+AMEL  
KITAMURA + AMEL  
KITAMURA + TSPY3  
TSPY3+AMEL+KITAMURA

# Técnicas de análisis

## Kits comerciales de tipificación de ADN



## Limitaciones

Equipos sofisticados y costosos



## Necesidad

Pruebas moleculares sencillas y baratas

# Reacción LAMP

## Overview of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)



© Copyright 2022 New England Biolabs. All Rights Reserved.

Link: <https://international.neb.com/tools-and-resources/video-library/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp-tutorial?autoplay=1>



# Amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP)

ADN Polimerasa *Bst*

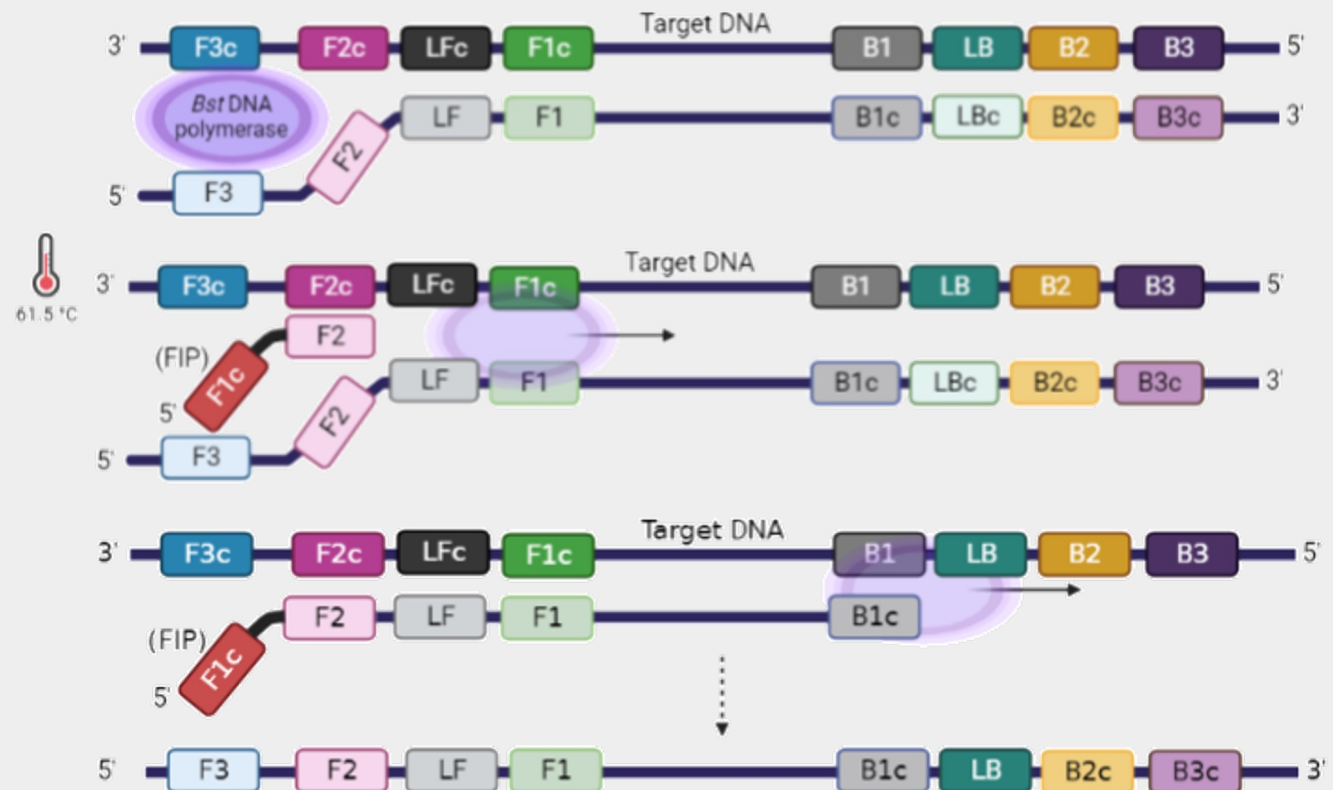
*Bacillus  
stearothermophilus*



Síntesis de ADN de desplazamiento de autociclado

Condiciones isotérmicas (60-65°C)

Técnica de diagnóstico molecular



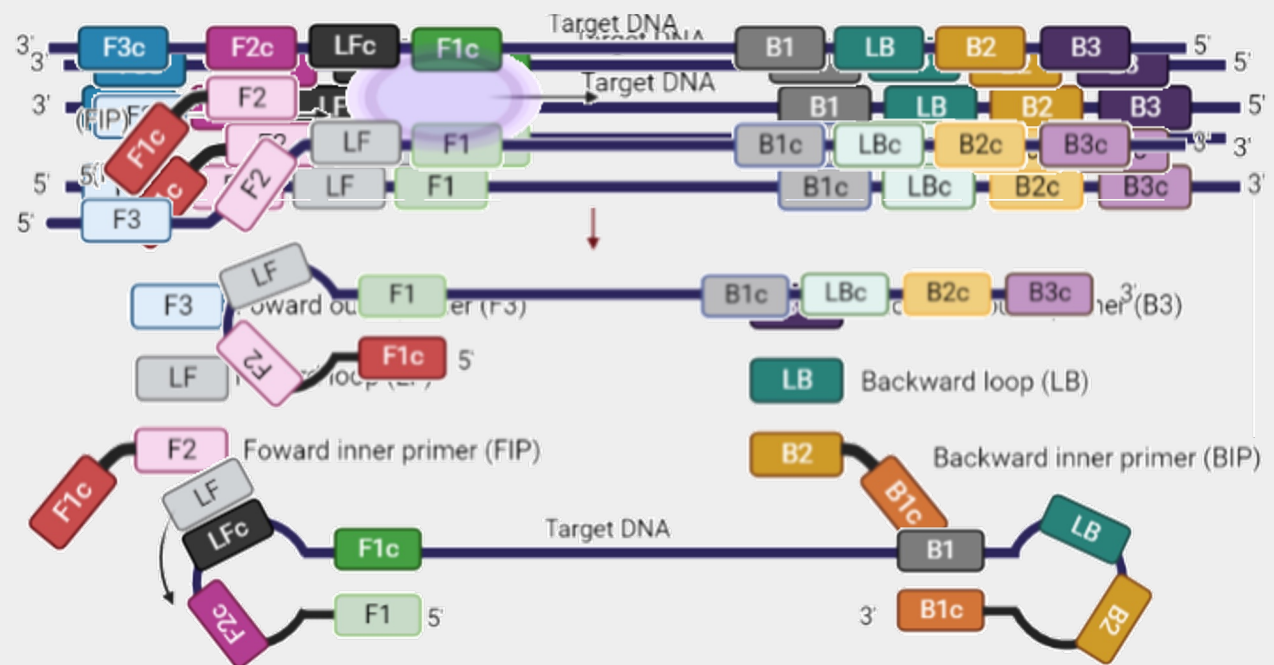
# Amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP)

## Cebadores (4-6)

- Externos (F3 – B3)
- Internos (FIP – BIP)
- De bucle (FL- BL)

Abarca más de 8 regiones distintas en un gen objetivo

Acelera la velocidad de la reacción, aumenta la especificidad y la sensibilidad



# Amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP)

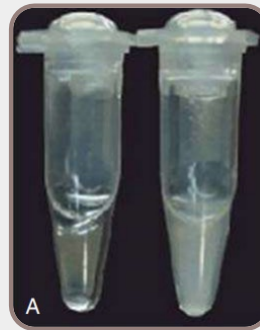
## Resultados



A simple vista

Tintes sensibles al pH

Rojo fenol



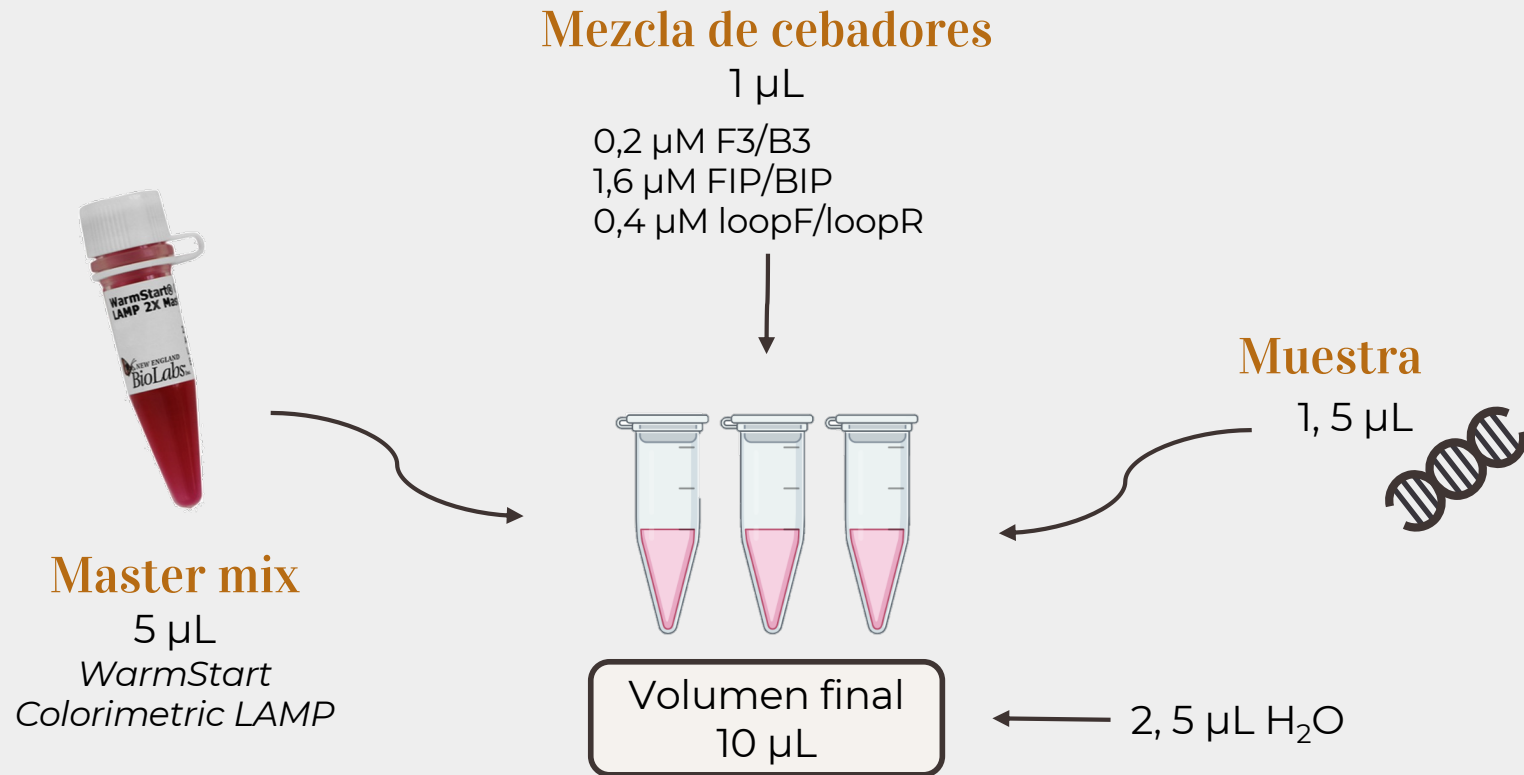
Mori & Notomi (2009)



Scott et al. (2019)

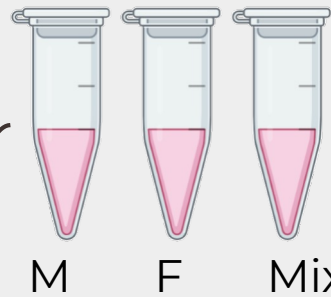
Cambio de color  
debido a la variación  
del pH de la reacción

# Reacción LAMP colorimétrica

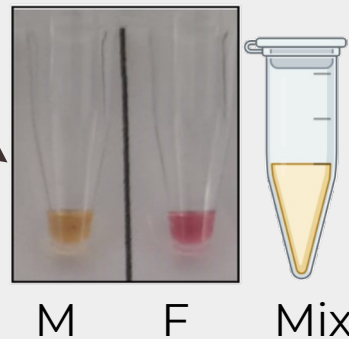


# Reacción LAMP colorimétrica

## Cambio de color



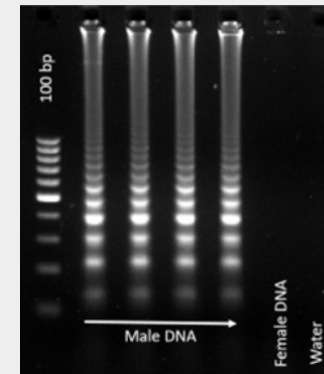
61.5°C  
45 minutos



## Confirmación

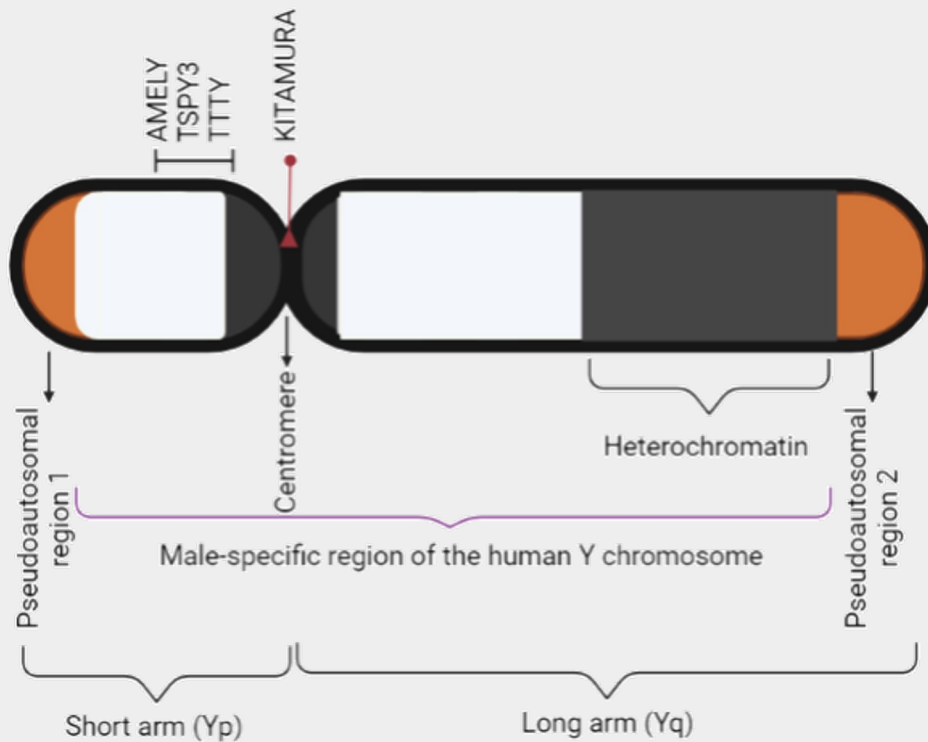


Electroforesis en gel de agarosa TBE 2%



# Conjunto de cebadores LAMP

**Tabla 1.** Conjunto de cebadores individuales



AMELY	Deleción de 6 pb en la primera region intrónica del gen de amelogenina
TTY2	Región de transcripción específica de testículos 2 ligada a Y
TTY7	YRegión de transcripción específica de testículos 7 ligada a Y
TSPY3	Proteína específica de testículo codificada en Y
KITAMURA	Regiones alfoides del cromosoma Y

**Primer mix**

TSPY3+AMEL  
 KITAMURA + AMEL  
 KITAMURA + TSPY3  
 TSPY3+AMEL+KITAMURA

# Sensibilidad de la mezcla final de cebadores

Conjunto de cebadores:  
KITAMURA + AMEL + TSPY3

Detección de la  
concentración de ADN  
masculino

0,0001 ng/uL

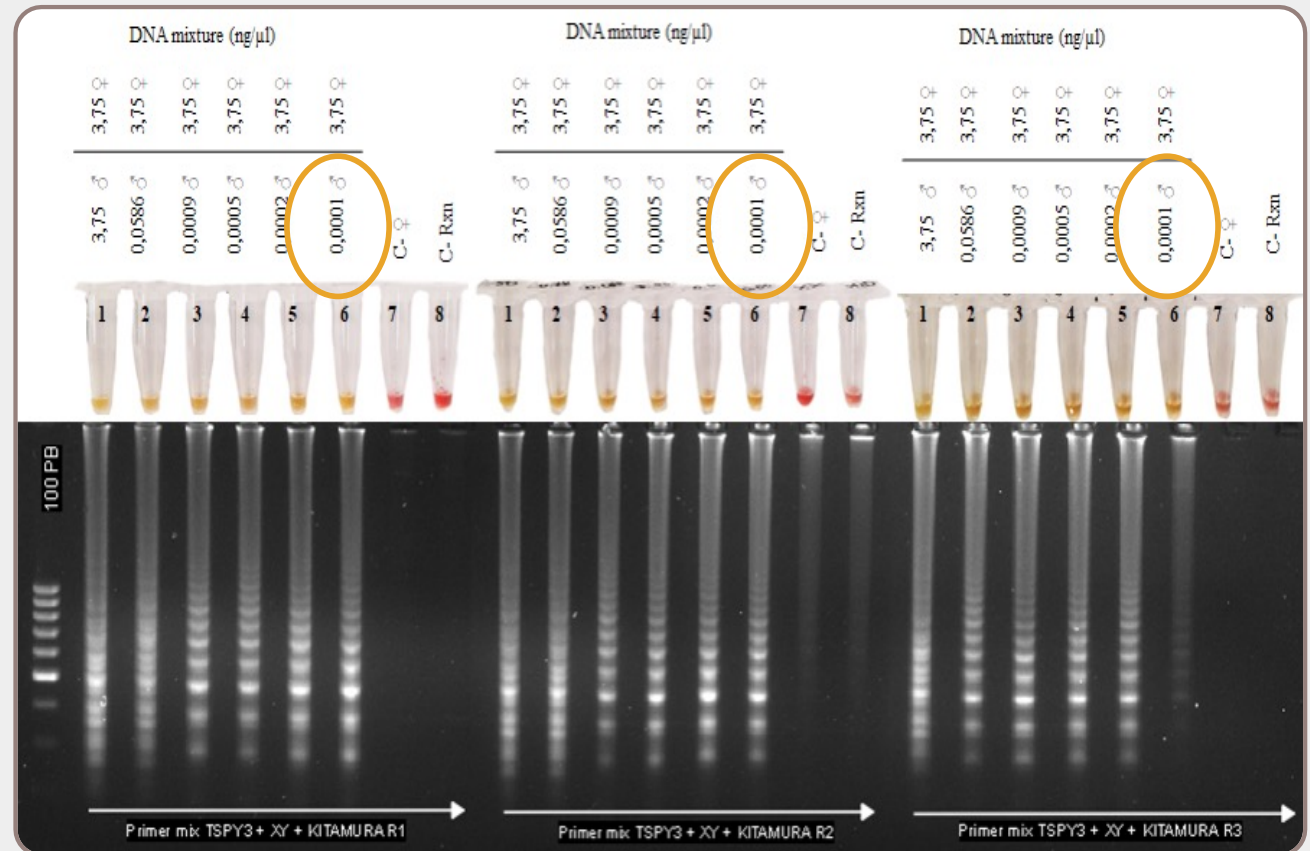


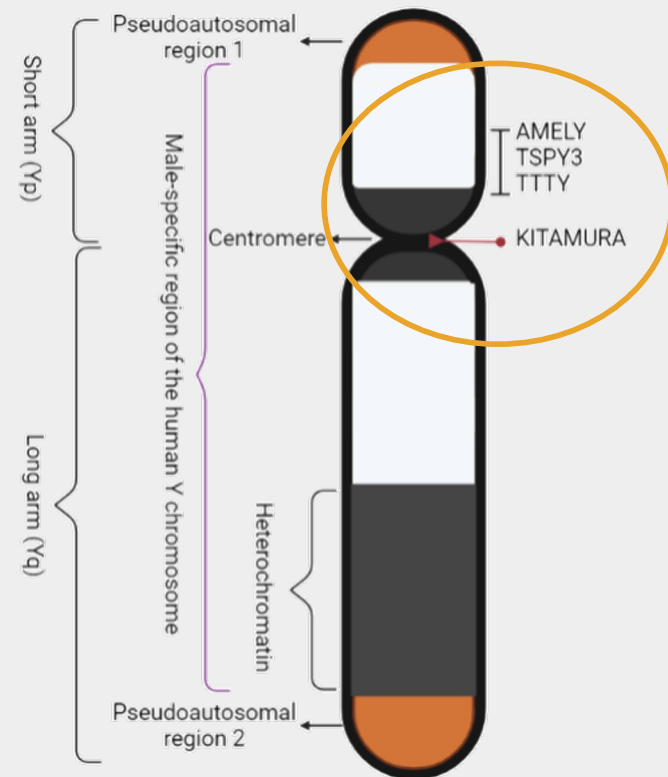
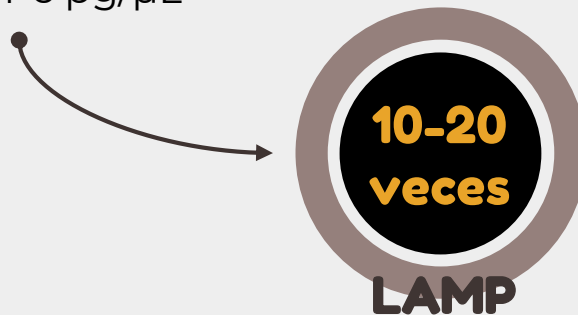
Figura 1. Ensayo de sensibilidad del ensayo multiple LAMP: KITAMURA/AMEL/TSPY3

# Rendimiento mejorado

## Co-amplificación

Diferentes secuencias objetivo  
Genes multicopia

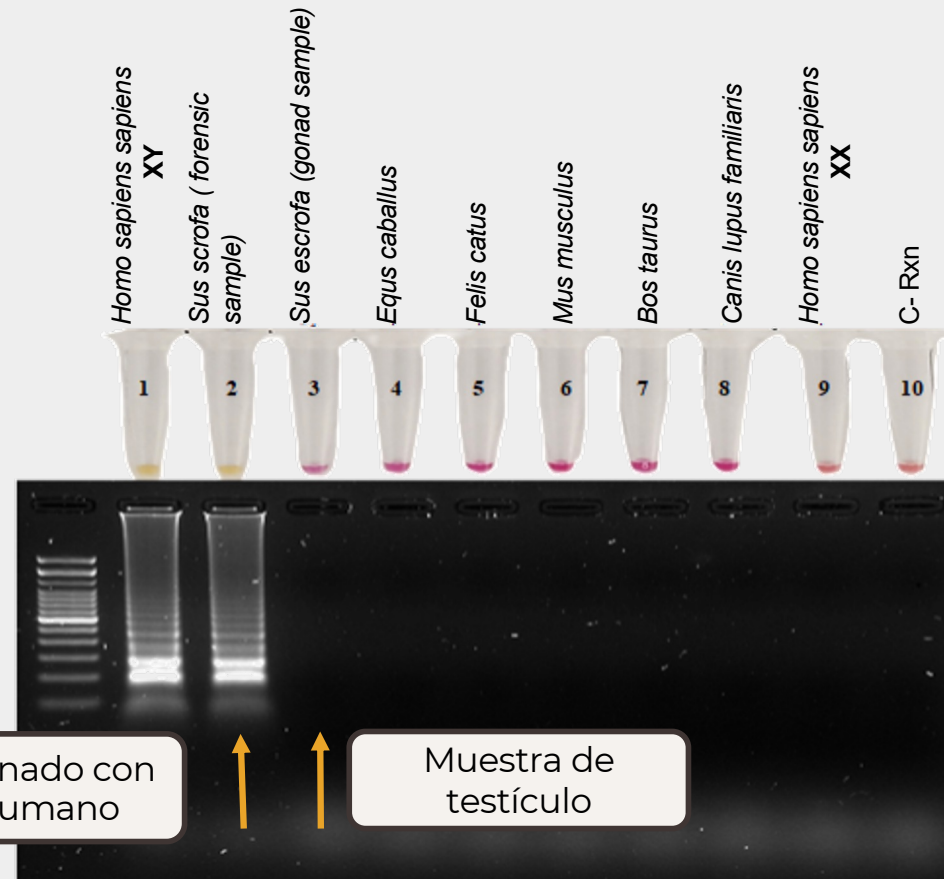
Kits de cuantificación de qPCR  
Límite: 1-6 pg/ $\mu$ L





# Especificidad de LAMP

Marcadores del cromosoma Y humano frente a 6 especies animales



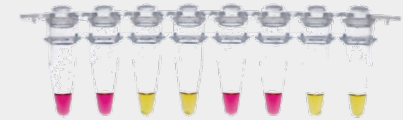
ADN extraído a partir de muestras de animales machos

Contaminado con ADN humano

Muestra de testículo

**Figure 2.** Especificidad de la técnica LAMP

# Objetivos



## General

Evaluar el desempeño del método LAMP para la determinación molecular de sexo en humanos, especificidad y límites de sensibilidad incluyendo mezclas, con muestras controladas que simulen un contexto forense.

## Específicos

---

Difundir el uso y las diversas aplicaciones de la técnica LAMP.

---

---

Recabar ideas sobre la potencialidad de LAMP con laboratorios de probada experticia forense.

---



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN

# Metodología



Coordinadores desde UDLA Quito enviarán mezcla de primers y muestras ciegas para los diferentes contextos.

New England Biolabs (NEB) enviará *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix* utilizando sus canales de distribución en los diferentes países (30 Labs).



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN

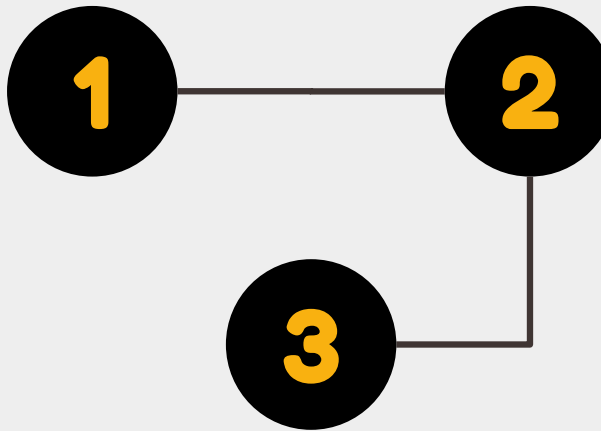


# Muestras ciegas DNA



## Sensibilidad del ADN masculino

1 - 0,01 - 0,0001 - 0,00001  
ng/ $\mu$ L



## Sensibilidad de las mezclas

ADA Masculino

1 - 0,01 - 0,0001 - 0,00001  
ng/ $\mu$ L

+

ADN Femenino

3,75 ng/ $\mu$ L

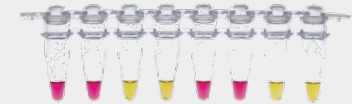
1:1

## Especificidad

Muestras de ADN animal

- *Felis catus* (gato)
- *Canis lupus familiaris* (perro)
- *Mus musculus* (ratón)
- *Sus scrofa* (cerdo)
- *Bos taurus* (toro)
- *Equus caballus* (caballo)

# Metodología



Reactivos suficientes para realizar 50 rxn de 15  $\mu$ L (triplicado).  
Exceso para evaluar algunas muestras de referencia propias.

Participantes deben enviar:  
Registros fotográficos en plantilla estándar y formato de resultados .

\*\*Opcional: registros electroforesis agarosa al 2%.



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN



# Metodología



Coordinadores: recopilar resultados y emitir informe preliminar en las jornadas GHEP 2023 (Cartagena).

Discusión de resultados, artículo científico (1 autor por Laboratorio).

## REQUISITOS:

Ser socios del GHEP-ISFG y estar al día en sus cuotas de mantenimiento.

Pagar cuota de participación de 50 Euros en el plazo establecido



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN



# Plazos ??



Fecha límite de inscripción:

**31 de noviembre 2022**

Fecha límite de pago:

**7 de febrero 2023**

Fecha límite para el envío de los resultados:

**un mes antes GHEP julio 2023?**



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN





# Coordinadores comisión:



Leonor Gusmão, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil: [leonorbgusmao@gmail.com](mailto:leonorbgusmao@gmail.com)

Jacobus de Ward, UDLA, Quito, Ecuador: [jacobusdeward@gmail.com](mailto:jacobusdeward@gmail.com)

Germán Burgos Figueroa, Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador:  
[hgermanburgosf@yahoo.com](mailto:hgermanburgosf@yahoo.com), [german.burgos@udla.edu.ec](mailto:german.burgos@udla.edu.ec)



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN







Germán Burgos  
Figueroa

Thank you !  
Gracias !  
Obrigado !



Katherin  
Barrionuevo



INVESTIGACIÓN  
Y VINCULACIÓN

