

Amplificación de secuencias de repetición única de microsatélites centroméricos de los cromosomas “X” e “Y” por medio de la reacción en cadena de la polimerasa

Mayor M.C. Gabriela **Mendoza-Díaz**, Mayor M.C. Ana Adriana **Guerrero-Terrazas**,
Mayor M.C. Juan Rubén **Hernández-Chávez***

Laboratorio Multidisciplinario de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México, D.F./Hospital Central Militar. México, D.F.

RESUMEN

Introducción. En la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos. Estos nucleótidos actúan como iniciadores para la síntesis *in vitro* del ADN. Esta técnica es de gran ayuda para las ciencias forenses, ya que con ella se logra determinar el origen de muestras sanguíneas, de cabello o esperma, en casos de violaciones, homicidios y todas las situaciones que impliquen un delito.

Metodología. En este trabajo se realizó la estandarización de la técnica de PCR para amplificar secuencias cortas de microsatélites centroméricos de los cromosoma “X” y “Y”. Encontrándose que a una concentración de 1.5 μM de MgCl_2 , se logra una adecuada amplificación de las secuencias mencionadas del cromosoma “X” y para el cromosoma “Y” se requiere una concentración de 1 μM .

Resultados. A la primer X4 le faltó una guanina (G). Se observó una banda de aproximadamente 150 pb que correspondió al cromosoma “X”, tanto en las muestras citológicas de mucosa vaginal, como en las de glándula. Se observó una banda de 200 pb que correspondió al cromosoma “Y”.

Discusión. Se pudo corroborar con lo descrito en la literatura que la variación en la concentración de MgCl_2 es un factor determinante para que se lleve a cabo la amplificación por medio de la técnica de RCP.

Palabras clave: microsatélites, amplificación, cromosoma, reacción en cadena de la polimerasa.

Centromeric microsatellites unique repetition sequences amplification of chromosomes “X” and “Y” by means of the polymerase chain reaction

SUMMARY

Introduction. In the polymerase chain reaction (PCR) technique two synthetic oligonucleotides of about 15-20 nucleotides are used. These nucleotides act like initiators for the *in vitro* DNA synthesis. This technique is helpful for forensic sciences, since it is managed to determine the origin of sanguineous samples, hair or sperm, in cases of violations, homicides and all the situations that imply a crime.

Methodology. In this work the standardization of the PCR technique was made to amplify short sequences of chromosome “X” and “Y” centromeric microsatellites. Finding that to a 1.5 μM concentration of MgCl_2 , is obtained a suitable amplification of the mentioned sequences of chromosome “X” and for the chromosome “Y” a concentration of 1 μM is required.

Results. To the first X4 a guanine (G) is missing. A band of approximately 150 pb was observed corresponding to chromosome “X”, as in cytological samples of vaginal mucosa, as in those of glands. A band of 200 pb was observed corresponding to chromosome “Y”.

Discussion. We could corroborate with the described in the literature that the variation in MgCl_2 concentration is a determining factor to amplify by means of the PCR technique.

Key words: Microsatellites, amplification, chromosome, polymerase chain reaction.

* Maestro en Medicina Forense, Especialista en Anatomía Patológica, Jefe de la Sección de Postmortem del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Central Militar

Correspondencia:

Gabriela Mendoza-Díaz

Calle Fuerte de Loreto #3, Unidad Habitacional Militar del Heroico Colegio Militar, Colonia San Pedro Mártir, Tlalpan, D.F.

Recibido: Marzo 23, 2006.

Aceptado: Mayo 15, 2006.

Introducción

La Genética Forense nació en Inglaterra en 1985 gracias al profesor de Genética de la Universidad de Leicester, Alec J. Jeffreys, quien, con base en sus conocimientos en genética y a su descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN, colaboró en la resolución de varios casos judiciales.¹

Para la técnica de PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos ("primers") actúan como iniciadores para la síntesis *in vitro* del ADN, la cual es catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquaticus*, que es capaz de activarse a temperaturas elevadas (72-85 °C), a estas temperaturas la enzima es capaz de extender las nuevas hebras de ADN a más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La PCR se lleva a cabo en una serie de ciclos, cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos: desnaturalización, hibridación y extensión.³

Esta técnica tiene gran aplicación en las ciencias forenses para identificación de individuos, para pruebas de paternidad y maternidad, para determinar el origen de muestras sanguíneas, de cabello o esperma, en casos de violaciones, homicidios y todas aquellas situaciones que impliquen un probable delito.⁴

Desde mediados de la década de 1990, se ha venido utilizando con gran éxito en la técnica de RPC, secuencias de ADN microsatélite conocidas también como Short Tandem Repeat (STR), las cuales están constituidas por ADN no codificante, localizados generalmente en las regiones subterminales de los cromosomas que son los implicados en los fenómenos de replicación, sobre todo de la línea germinal masculina, que presentan un gran polimorfismo y cuyo tamaño es muy pequeño (hasta 400 pb), lo que los hace ideales para dicha técnica aplicada con fines de identificación forense.

Los STR localizados en el cromosoma "Y" han sido ampliamente estudiados y utilizados por las ciencias forenses para la identificación de individuos masculinos. Estos microsatélites han tenido una significancia especial en los casos forenses donde existe una mezcla de ADN femenino y masculino para analizar, tal como ocurre en los casos de violación u otros crímenes de índole sexual. Las características de su alto número de copias, herencia materna y alto grado de variabilidad en sus secuencias, convierte a estas secuencias del cromosoma "Y" en un arma poderosa para la identificación forense.^{5,6}

El estudio del cromosoma "Y" ha tenido en los últimos años un gran impacto en múltiples áreas, tanto biológicas como sociales. Actualmente se estudian diversos microsatélites de dicho cromosoma para estudios poblacionales y de migración en las ciencias antropológicas, para determinación del sexo fetal como técnica no invasiva, como marcadores de paternidad, para estudios de infertilidad en hombres, así como para identificación forense.⁷⁻¹⁰

En febrero del año en curso, Zenilman y cols. realizaron un estudio para la detección de secuencias del cromosoma Y en fluidos vaginales por medio de la técnica de RPC, a fin de determinar la actividad sexual reciente en mujeres. Estos investigadores utilizaron primers que amplificaban microsatélites tanto de cromosoma "Y" como de "X", obteniendo resultados positivos.¹¹

Metodología

A. Voluntarios.

Para la realización del presente trabajo de investigación, se utilizaron cinco mujeres y cinco hombres voluntarios que nos proporcionaron muestras citológicas obtenidas por cepillado de mucosa vaginal y mucosa del glande.

B. Material y métodos

a. Toma de muestras. La toma de muestras se realizó por medio de raspado con cepillo para toma de muestras citológicas (citobrush) de las paredes vaginales y glande; se colectaron en tubos de eppendorf con 1 mL de Buffer de extracción (EDTA 0.02M, Tris 0.01M, SDS 0.5%) y se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

b. Extracción y purificación de ADN. La extracción del ADN a partir de muestras citológicas de mucosa vaginal, mucosa oral y mucosa del glande se realizó por medio de la técnica descrita por Sambrook y col. 1994.

c. Valoración de la pureza e integridad del ADN. A 5 mL de ADN se adicionó 1 mL de buffer de carga (20% Ficoll 400, 0.1M Na2EDTA a un pH de 8, 1% SDS y 0.25% de azul de bromofenol) y se separó en geles de agarosa (Invitrogen) a 1% y TBE 0.5X (Tris-HCL 88 µM, ácido bórico 88 mM, EDTA 2 mM) teñidos con bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis horizontal modelo Horizon 58 (Gibco BRL Life Technologies) a un voltaje constante de 70 volts durante 15 minutos, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz UV (LKB 20011 Macrovue) para corroborar la existencia de ADN en las muestras y poder amplificarlas por medio de RPC; se fotografiaron con una cámara Polaroid modelo MP-4.

d. Amplificación de los fragmentos de ADN por RPC. A 1.5 µL de ADN se adicionó 10.5 µL de una mezcla de reacción que contenía: 2 U/ µL Taq polimerasa (Invitrogen), 0.75 mM de cada uno de los oligonucleótidos para cromosoma "Y" o "X", 2 µM de MgCl2, 20 mM de dNTPs y buffer 1X para la enzima Taq polimerasa (Invitrogen). La mezcla de reacción fue sometida a las siguientes condiciones en un termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System 9600). Una desnaturalización a 94 °C durante dos horas y 30 minutos, seguido por dos ciclos de amplificación, el primero con tres ciclos: 94 °C dos minutos, 60 °C dos minutos y 72 °C dos minutos; el segundo con 25 ciclos 94 °C un minuto, 60 °C un minuto y 72 °C un minuto. Al término de los ciclos

Cuadro 1. Secuencias de los primers utilizados por Zenilman y las secuencias registradas en el banco de genes.

Primer	Secuencia publicada por Zenilman	Secuencia registrada en el banco de genes
X3	5'-TAT TTG GAC TCT CTC TGA GGA	5'-TAT TTG GAC TCT CTC TGA GGA
X4	5'-TTC TAC TAC AAG GGT GTT CA	5'-TTC TAC TAC AAG GGT GTT CA
Y3	5'-GTG TAT TCA CCT CCG GGA G	5'-GTG TAT TCA CCT CCG GGA G
Y4	5'-ACA AAA GGT TCA ATT CTG TGA G	5'-ACA AAA GGT TCA ATT CTG TGA G

La única variación entre las secuencias de los primers publicados por Zenilman y los registrados en el banco de genes corresponde a una guanina (G) en el último triplete de X4.

se dio una extensión final de 72 °C por cinco minutos. El producto de esta reacción se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

e. Análisis de los fragmentos de ADN por electroforesis. Del producto de la RPC se tomó 4 µL y se le adicionó 1 µL de buffer de carga (20% Ficoll 400, 0.1M Na2EDTA aun pH de 8, 1% SDS y 0.25% de azul de bromofenol), se separó en un gel de agarosa (3%) y TBE 0.5X (Tris-HCL 88 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 2 mM) teñido con una solución de bromuro de etidio, en una cámara de electroforesis horizontal modelo Horizon 58 (Gibco BRL Life Technologies) a un voltaje constante de 90 volts durante 30 minutos; a través de un transiluminador de luz UV (LKB 20011 Macrovue) y se buscaron bandas de 200 pb para cromosoma el cromosoma “Y” y de 157 pb para el cromosoma “X”. Se fotografiaron con una cámara Polaroid modelo MP-4.

Resultados

Como paso inicial antes de aplicar la técnica de RPC a las muestras, se verificó en un banco de genes la secuencia de los primers utilizados por Zenilman y cols., ya que si las secuencias publicadas eran incorrectas, los primers no se acoplarían al ADN y no se llevaría a cabo la amplificación de los segmentos de los cromosomas.

Se encontró que a la secuencia del primer X4 le faltaba una guanina (G) como se muestra en el *cuadro 1*.

Se aumentó el número de ciclos del termociclador; de 25 ciclos que fueron los publicados en el artículo original se aumentaron a 35 ciclos, esto con la finalidad de aumentar la cantidad del producto de la RPC, y poder observar bandas más nítidas.

Se realizó extracción de ADN a cinco muestras citológicas de mucosa vaginal y a cinco de mucosa de glánde, y posteriormente se procedió a la amplificación del ADN por medio de la técnica de RPC.

Se observó una banda de aproximadamente 150 pb que correspondió al cromosoma “X”, tanto en las muestras citológicas de mucosa vaginal, como en las de glánde; también se observó una banda de aproximadamente 200 pb que correspondió al cromosoma “Y”, el cual únicamente se visualizó en las muestras de mucosa de glánde (*Figura 1*).

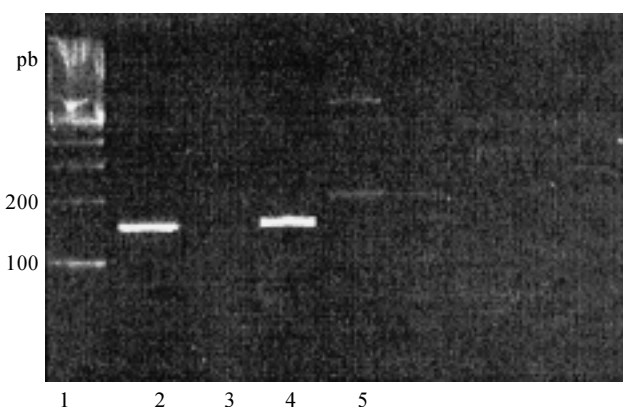


Figura 1. Amplificación de las secuencias de los cromosomas “X” y “Y”. Electroforesis en gel de agarosa a 3% del producto de PCR, en donde se muestra en el carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb, los carriles 2 y 3 corresponden a la muestra citológica de mucosa vaginal, donde podemos observar que se amplificó el cromosoma “X” (carril 2), pero no el “Y” (carril 3). Los carriles 4 y 5 corresponden a la muestra de mucosa de glánde, obsérvese cómo aparecen tanto la banda para el cromosoma “X” (carril 4) y para el cromosoma “Y” (carril 5).

Se realizaron curvas de sensibilidad para el MgCl₂ tanto para las muestras citológicas de mucosa vaginal (cromosoma “X”) como para las muestras citológicas de mucosa de glánde (cromosoma “Y”). Las concentraciones utilizadas se muestran en los *cuadros 2 y 3*, respectivamente.

Para la enzima Taq polimerasa se realizó curva de sensibilidad únicamente con las muestras citológicas de mucosa vaginal, las concentraciones utilizadas se muestran en el *cuadro 4*. Esto con el propósito de determinar las concentraciones óptimas de reacción de estas sustancias, y lograr que las bandas fueran más claras y eliminar cualquier otra banda que no correspondiera a los citado cromosomas.

Como se aprecia en la *figura 2*, que corresponde a la curva de sensibilidad del MgCl₂ con las muestras citológicas de mucosa vaginal (cromosoma “X”), a una concentración de 1.5 µM, aparece una banda de 150 pb correspondiente al cromosoma “X”, la cual es bastante clara.

En la *figura 3* observamos la curva de sensibilidad del MgCl₂ con las muestras citológicas de mucosa de glánde, con una concentración de 1mM la banda de 200 pb que corresponden al cromosoma “Y” es claramente visible.

Cuadro 2. Concentraciones de MgCl₂ utilizadas para la curva de sensibilidad para el cromosoma "X".

MgCl ₂ (Conc. final)	MgCl ₂ (Vol. final)
2.5 µM	0.62 µL
2.0 µM	0.5 µL
1.5 µM	0.37 µL
1.0 µM	0.25 µL

La concentración utilizada en el artículo original fue de 2.0 µM, a partir de la cual se determinaron las concentraciones utilizadas para la curva de sensibilidad.

Cuadro 3. Concentraciones de MgCl₂ utilizadas para la curva de sensibilidad para el cromosoma "Y".

MgCl ₂ (Conc. final)	MgCl ₂ (Vol. final)
2.5 µM	0.62 µL
2.0 µM	0.5 µL
1.5 µM	0.37 µL
1.0 µM	0.25 µL

La concentración utilizada en el artículo original fue de 2.0 µM, a partir de la cual se determinaron las concentraciones utilizadas para la curva de sensibilidad.

Cuadro 4. Concentraciones de enzima Taq polimerasa utilizadas para la curva de sensibilidad para el cromosoma "X".

Taq polimerasa (Conc. final)	Taq polimerasa (Vol. final)
1.5 U/ µL	0.3 µL
1.0 U/ µL	0.2 µL
0.5 U/ µL	0.1 µL
0.25 U/ µL	0.05 µL

La concentración utilizada en el artículo original fue de 2.0 µM, a partir de la cual se determinaron las concentraciones utilizadas para la curva de sensibilidad.

La figura 4 muestra la curva de sensibilidad de la enzima Taq polimerasa con las muestras citológicas de mucosa vaginal, observando que a una concentración de 0.25 U/ mL la banda correspondiente al cromosoma "X" se visualiza perfectamente.

Discusión

De la curva de sensibilidad del MgCl₂ para el cromosoma "X" (Figura 2) podemos observar que en los carriles correspondientes a las concentraciones 2.5, 2.0 y 1.5 µM apareció una banda nítida y sin barrido de 150 pb para el cromosoma "X", lo que no sucedió con el último carril, el cual corresponde a una concentración de 1.0 µM, por lo que se decidió utilizar el MgCl₂ a una concentración de 1.5 µM para amplificar el cromosoma "X".

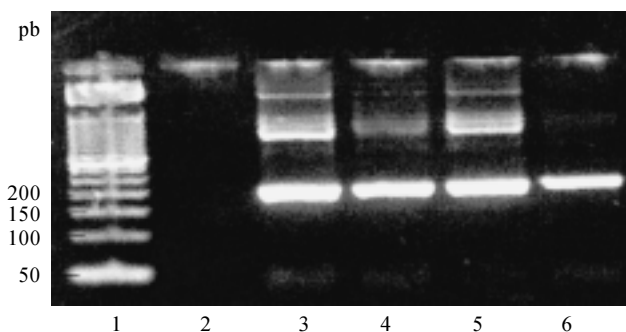


Figura 3. Curva de sensibilidad del MgCl₂ para el cromosoma "Y". Electroforesis en gel de agarosa a 3% donde se muestran las bandas de 200 pb correspondientes al cromosoma "Y". En el carril 1 el marcador de tamaño molecular de 50 pb, en el carril 2 se muestra un control negativo (cromosoma "X"), el carril 3 corresponde a la concentración 2.5 µM, el carril 4 corresponde a la concentración 2 µM, el carril 5 a la concentración 1.5 µM y el carril 6 a la concentración 1 µM. Obsérvese cómo la banda del carril 6 es bastante clara y con menos efecto de barrido.

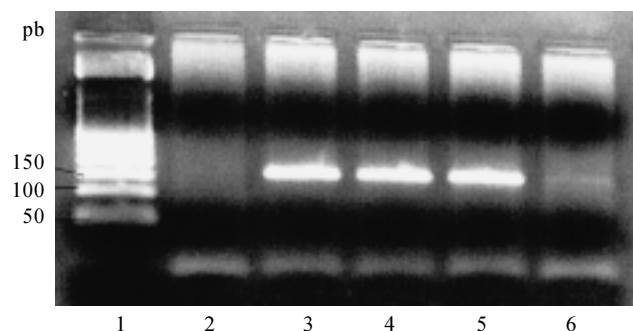


Figura 2. Curva de sensibilidad del MgCl₂ para el cromosoma "X". Electroforesis en gel de agarosa a 3% donde se muestran las bandas de 150 pb correspondientes al cromosoma "X". En el carril 1 el marcador de tamaño molecular de 50 pb, en el carril 2 se muestra un control negativo (cromosoma "Y"), el carril 3 corresponde a la concentración 2.5 µM, el carril 4 corresponde a la concentración 2 µM, el carril 5 a la concentración 1.5 µM y el carril 6 a la concentración 1 µM. Obsérvese que la banda del carril 5 es bastante clara, y que en el carril 6 ya no aparece la banda del cromosoma "X".

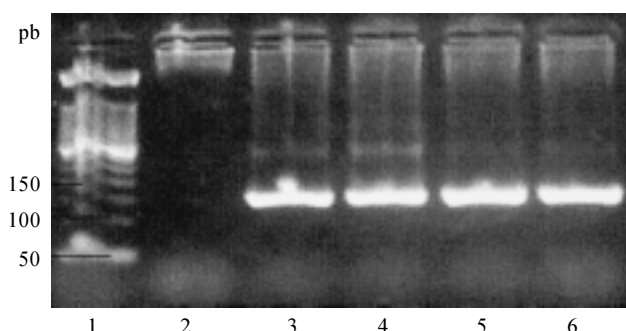


Figura 4. Curva de sensibilidad para la enzima Taq polimerasa. Electroforesis en gel de agarosa a 3% donde se muestran las bandas de 150 pb correspondientes al cromosoma "X". En el carril 1 el marcador de tamaño molecular de 50 pb, en el carril 2 se muestra un control negativo (cromosoma "Y"), el carril 3 corresponde a la concentración 1.5 U/ µL, el carril 4 corresponde a la concentración 1 U/ µL, el carril 5 a la concentración 0.5 U/ µL y el carril 6 a la concentración 0.25 U/ µL. Obsérvese cómo la banda del carril 6 es bastante clara y con menos efecto de barrido.

La curva de sensibilidad del MgCl₂ para el cromosoma “Y” (*Figura 3*) nos mostró bandas de 200 pb muy visibles para todas las concentraciones, pero sólo en el último carril se observa que la banda del cromosoma “Y” no presenta barrido. Por lo que se estableció que la concentración óptima de reacción del MgCl₂ para el cromosoma “Y” es de 1.0 µM. Es importante considerar que un exceso en este reactivo puede inhibir la RPC y una cantidad escasa no permite que se lleve a cabo la reacción.

Con respecto a la curva de sensibilidad para la enzima Taq polimerasa (*Figura 4*), observamos que en todas las concentraciones se observa claramente la banda de 150 pb que corresponde al cromosoma “X”, con lo que se determinó que la concentración óptima de reacción de la Taq polimerasa es de 0.25 U/µl. Únicamente se realizó la curva de sensibilidad de la enzima Taq polimerasa para el cromosoma “X”, debido a que con la concentración de 1.5 µM de MgCl₂ observamos que mejoró la calidad de las bandas para ambos cromosomas, además que desapareció el barrido y otras bandas que no correspondían a los citados cromosomas. Con lo que pudimos corroborar con lo descrito en la literatura, que la variación en la concentración de MgCl₂, es un factor determinante para que se lleve a cabo la amplificación de DNA por medio de la técnica de RPC.

Referencias

1. Entrala C. Técnicas de análisis del ADN en genética forense. Laboratorio de ADN forense, Depto. de Medicina Legal, Universidad de Granada, España. Publicada: //E:Estudio%20del%20DNA%20para%20las%20ciencias%20forenses.htm
2. Biología molecular de la célula. 3a. Ed. España: Editorial Omega; 2002, p. 106-7.
3. García ME. La utilización del ácido desoxirribonucleico para la aplicación de la justicia en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Políticas. Universidad Internacional de América en Ciudad Victoria. Publicado en: www.unida.edu.mx
4. Hernández JR y cols. Concordancia en la identificación de muestras citológicas de pene y vagina y su utilidad como prueba pericial en casos de violación con cópula vaginal. México: 2004.
5. Fukushima H. Forensic DNA analysis past and future. Nippon Hoigakki Zasshi 1999; 53(3): 276-84.
6. Wolf A, Caliebe A, Junge O, Krawczak M. Forensic interpretation of Y-chromosomal DNA mixtures. Forensic Sci Int 2005; 152(2-3): 209-13.
7. Tungwiwat W, Fucharoen G, Ratanasiri T. Non-invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2003; 334(1-2): 173-7.
8. Lazar L, Ban Z, Szakacs O. Fetal sex determination with real time PCR of fetal DNA in maternal plasma. Orv Hetil 2003; 144(49): 2405-9.
9. Li J. Chromosome STR genetic markers in paternity identification. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2004; 29(4): 432-4.
10. Roy R. Analysis of human fecal material for autosomal and Y chromosome STRs. Forensic Sci 2003; 48(5): 1035-40.
11. Zenilman JM, et al. Polymerase chain reaction detection of Y chromosome sequence in vaginal fluid: preliminary studies of a potential biomarker for sexual behavior. Sex Transm Dis 2005; 32(2): 90-4.