



# DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

SEMINARIO  
FINAL DE  
GENÉTICA  
MOLÉCULAR

DOCENTE:  
ARÁN, M.

ALUMNAS: ROMERO NASRALA, F.E., SAMUDIO, S. Y VALDEZ, G.



## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Actualmente en Argentina existe un gran aumento de casos de abuso sexual, por ello es necesario contar con una metodología de análisis específica, para la identificación certera de fluido seminal humano, en base a ello actualmente se utilizan metodologías de inmunocromatografía que contribuyen a la determinación de este fluido en particular, no obstante es necesario la incorporación de un kit que nos permita acreditar la existencia fehaciente de células específicas, lo cual permitiría un posterior análisis genético a los fines de identificar al sospechoso, como lo es para estos casos las células de espermatozoides. Para ello es que la contribución de un kit específico de inmunofluorescencia arrojaría resultados categóricos, logrando identificar dicha célula, para luego aislarla y así contribuir con una prueba contundente que nos permita a posterior la identificación de un autor en los hechos de abuso sexual.

La identificación precisa de los actores involucrados en casos de abuso sexual es un componente crítico en la búsqueda de justicia y la protección de las víctimas. En este contexto, las muestras biológicas obtenidas en una escena del crimen, como fluidos corporales, pueden contener información valiosa que puede vincular a un agresor con el delito. Uno de los elementos clave para esta identificación es la detección de proteínas específicas presentes en las cabezas espermáticas, entre las cuales según bibliografía consultada se halla a la proteína 3, isoforma 1, situada en el acrosoma del espermatozoide. La proteína 3, isoforma 1, juega un papel fundamental en la fertilización al estar involucrada en los procesos de reconocimiento y unión entre el espermatozoide y el óvulo. Esta proteína se localiza en el acrosoma, una estructura que recubre la cabeza del espermatozoide y es esencial para la penetración en la membrana del óvulo.

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

Debido a su función crítica en la fecundación, la detección de esta proteína en muestras biológicas puede ser un indicador concluyente de la presencia de espermatozoides humanos, proporcionando así una pieza esencial en el rompecabezas forense.

La capacidad de detectar la proteína 3, isoforma 1 en fluidos seminales no solo permite confirmar la presencia de espermatozoides, sino que también ofrece la posibilidad de identificar al autor del abuso mediante un posterior análisis genético.

Mediante el análisis de esta proteína, los investigadores pueden aislar la cabeza espermática portadora del núcleo celular y material genético del donante de la muestra seminal, y así vincular biológicamente al sospechoso con el acto delictivo, estableciendo una conexión que puede ser invaluable en el contexto legal. La evidencia forense generada a partir de la identificación de esta proteína fortalece los casos en tribunales, apoyando las acusaciones y proporcionando a las víctimas un camino hacia la justicia.

Es por ello, que el presente trabajo se enfocará en el diseño de un nanoanticuerpo mediante el uso de vectores por medio del inserto de un antígeno en un camélido y su posterior extracción de células linfocíticas B del suero que contenga el nanoanticuerpo de interés para el desarrollo de un Kit.

En virtud de lo expuesto, a continuación, se procede a realizar una breve descripción acerca de los nanoanticuerpos.

### **1.1. Nanoanticuerpos: estructura y propiedades**

Los nanoanticuerpos, los cuales llamaremos Nac de ahora en más,

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

presentan su región de reconocimiento antigénico el cual consiste únicamente en un dominio variable por cada cadena con un peso ~15 kDa. Tienen cualidades estructurales únicas en función de su origen, por ejemplo, la presencia de 9 cadenas tipo Beta en camélidos (Govaert et al., 2012).

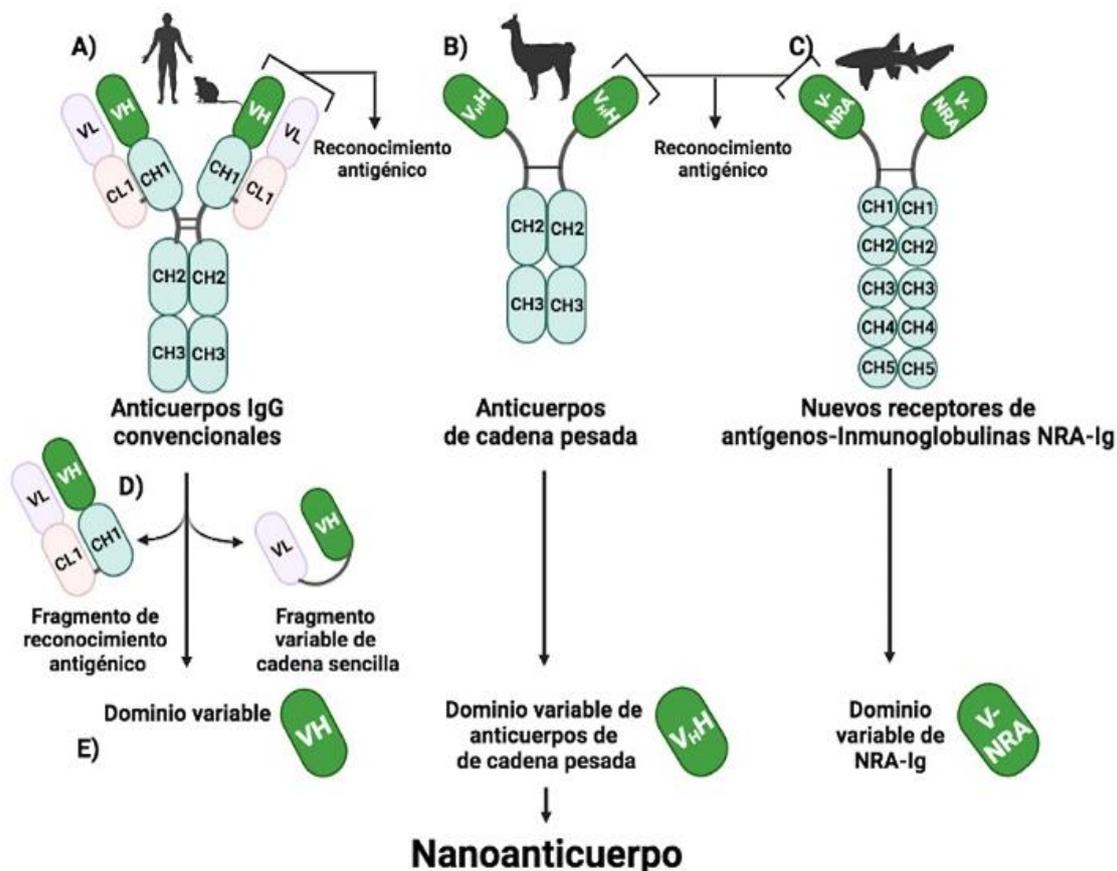
Su capacidad de reconocimiento, a pesar de tener un tamaño casi 10 veces menor a un anticuerpo convencional, ocurre gracias a la presencia de regiones determinantes de complementariedad, más conocidas como CDRs (del inglés *Complementarity Determining Regions*), donde también se han evidenciado regiones diferentes, siendo en los camélidos 3 distintas por cada dominio. En este caso CDR1 y 3 tienen mayor longitud y variabilidad. El CDR3 de los Nac, tiene 6 y 4 residuos de aminoácidos adicionales con respecto a los dominios de cadena pesada de los ratones y humanos respectivamente. Estas condiciones mencionadas en adición a un puente disulfuro adicional ubicado entre CDR1 y CDR3, es que la estructura presenta estabilidad. Esta interacción se encuentra ausente en los anticuerpos convencionales (Govaert et al., 2012; Stanfield et al. 2007).

Estas características, brindan a los Nac, una superficie suficiente para reconocer antígenos de forma similar a los fragmentos de reconocimiento de cadena sencilla compuestos por los dominios variables de cadena pesada y ligera (Siontorou et al., 2013).

Además, estos cambios de plegamiento y de secuencia, brindan mayor solubilidad a los Nac, dando lugar a una estructura alargada o esferoide relacionada con una mayor exposición del lugar específico de unión del anticuerpo con el antígeno, que aunado a su reducido tamaño, facilitan el reconocimiento de

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

epítopos antigénicos que son de difícil acceso para los anticuerpos convencionales (Siontorou *et al.*, 2013).



**Figura 1: Esquema de anticuerpos convencionales y anticuerpos de cadena pesada.**

**A)** Anticuerpos tipo IgG heterodímeros compuestos por dos cadenas pesadas (CH1, 2, 3 y un VH) y dos cadenas ligeras (CL1 y VL) y la región de reconocimiento antigénico (VH y VL).

**B)** Anticuerpos de cadenas pesadas-homodímero (CH2,3) y la región de reconocimiento antigénico (VHH).

**C)** Nuevo receptor antigénico de Inmunoglobulinas NRA-Ig-homodímero de dos cadenas pesadas (CH1-5) y la región de reconocimiento antigénico (V-NAR).

**D)** Fragmento de reconocimiento antigénico (CH1-CL1 y VH-VL) y fragmento variable de cadena sencilla (VH-VL).

**E)** Dominios variables de reconocimiento.

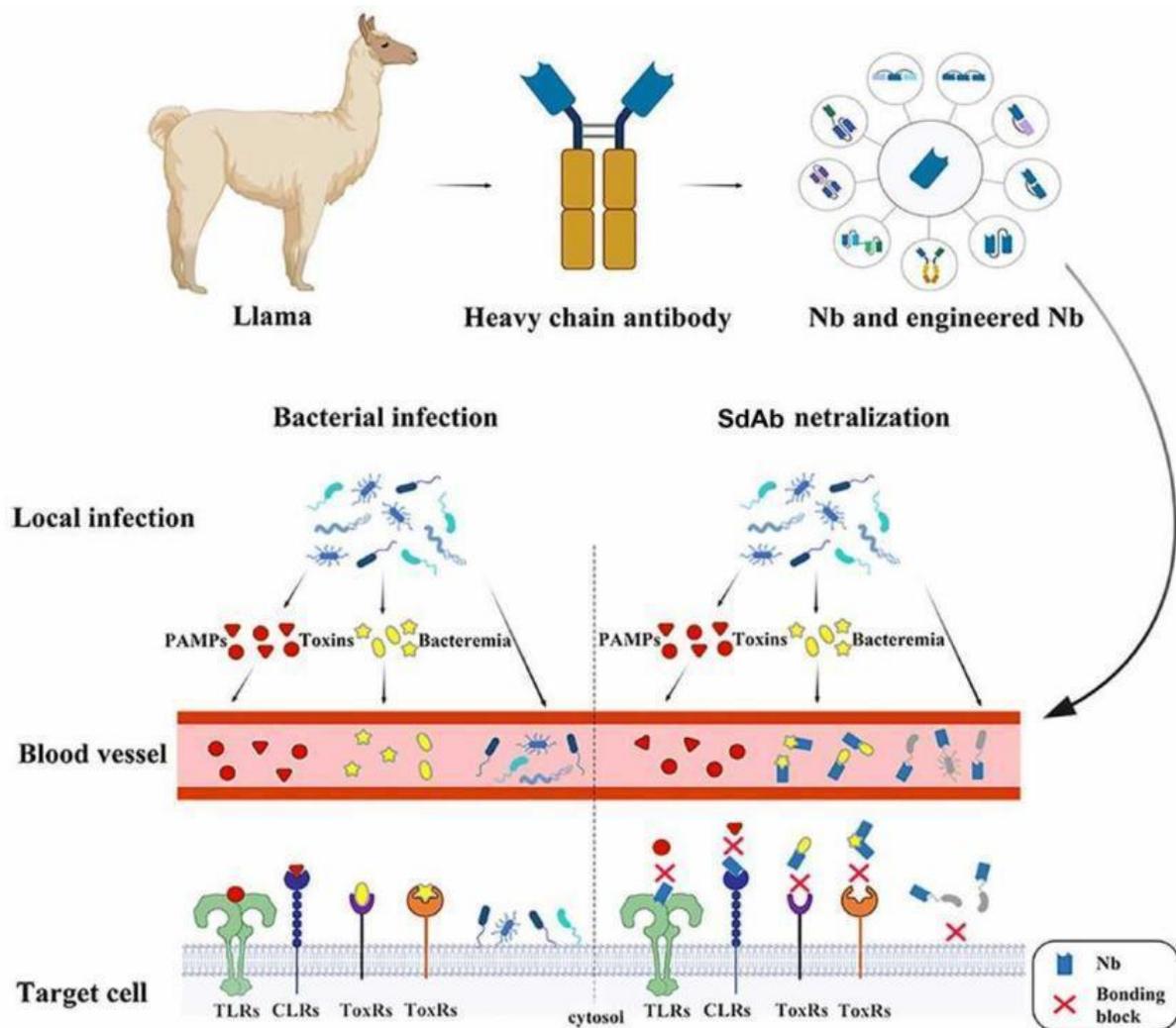
**Abreviaturas:** CH: Dominio constante de cadena pesada, CL: Dominio constante de cadena ligera, V H/L: Dominio variable, VHH: Dominio variable de anticuerpo de cadena pesada, V-NRA: Dominio variable del nuevo receptor antigénico.

### 1.2. Desarrollo biotecnológico: Bibliotecas

El desarrollo y selección de los Nac a partir de bibliotecas inmunes (Figura 2), implica la inmunización con el antígeno o molécula de interés a animales que

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

desarrollen de manera natural anticuerpos de cadena pesada. Los pertenecientes a la familia *Camelidae* como llamas, alpacas y camellos, son ampliamente usados en la construcción de este tipo de bibliotecas.



**Figura 2: Esquema de la construcción de una biblioteca de Nanoanticuerpos usando partículas fágicas.**

La extracción de sangre puede ser de camélidos previamente inmunizados o no. Se separan los linfocitos B, se extrae el RNAm, y mediante RT-PCR se sintetiza DNAc, el cual se expone a oligos que permiten amplificar al Nac específicamente mediante PCR. Estas secuencias amplificadas son insertadas en vectores de clonación que son utilizados para transformar a *E. coli* TG1, dando lugar a la biblioteca de Nac. Finalmente, esta es transfectada con una partícula fágica que permite el despliegue de Nac unidos a proteínas de la superficie fágica, representando una plataforma idónea para interactuar con la molécula blanco.

**Abreviaturas:** RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RNAm: RNA mensajero, DNAc: DNA complementario.

**Fuente:** [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2021000100220#B48](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2021000100220#B48)

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

### **2. OBJETIVOS**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Diseñar un kit de inmunofluorescencia para la identificación específica de células de espermatozoides humanos.

#### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer a la proteína 3 isoforma 1 como blanco para hacer inmunohistoquímica para luego ser marcada, aislada y analizada.
2. Producir un anticuerpo de camélido complementario a la proteína específica seleccionada, fusionado a una proteína fluorescente.
3. Diseñar los diferentes componentes a utilizar en el kit.
4. Desarrollar el protocolo para toma de muestra, análisis e interpretación de resultados.
5. Comparar el *Kit* desarrollado con otras determinaciones y su especificidad

### **3. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Mediante la detección específica de la proteína 3, isoforma 1, la cual se encuentra contenida en la superficie de la cabeza espermática humana, mediante *nanobodies* de camélidos, se espera identificar al individuo aportante de una muestra espermática, aplicado a casos de agresión sexual.

### **4. ANTECEDENTES**

La identificación de agresores sexuales para la resolución de casos de abuso



## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

sexual ha sido desde siempre uno de los mayores requerimientos periciales en el ámbito de la Justicia de Argentina. A lo largo de la historia se fueron desarrollando varias técnicas, las cuales, de acuerdo a los recursos de cada laboratorio, para establecer la presencia de fluido seminal, ya sea de manera orientativa o certera, abarcando desde cristalografía al microscopio hasta inmunoensayos. Seguido a establecer la presencia de este fluido se debe realizar un análisis de los marcadores STR de la muestra, a los fines de ser cotejado con el perfil genético del presunto autor y de esta manera realizar los análisis de las hipótesis en lo que desemboca en un índice de verosimilitud (LR). Actualmente, uno de los kits más utilizados para llevar a cabo la determinación de presencia de fluido seminal, es a través de inmunocromatografía detectando su antígeno prostático específico (PSA). Posterior a ello se analiza genéticamente.

A su vez, existen kits comerciales para la detección por inmunofluorescencia para muestras de abuso sexual, en las cuales se busca aislar la cabeza de la célula espermática, la cual contiene el ADN de su aportante. La problemática de ello es que, al tratarse de reactivos hechos en el exterior, tienen costos elevados y presentan trámites de ingreso al país que complican su obtención, en especial para entidades estatales.

### **5. CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO**

El desarrollo de un kit de identificación por inmunofluorescencia forense para la detección específica de la proteína 3, isoforma 1, contenida en la cabeza espermática humana, portadora del material genético, mediado por *nanobodies* de camélidos, representa una herramienta innovadora y necesaria para los

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

profesionales en el ámbito científico. Contar con un kit que permita realizar análisis específicos en muestras biológicas, significa un aumento en la eficacia en la identificación de agresores. La implementación de esta tecnología no solo tiene el potencial de mejorar los procedimientos actuales de recolección y análisis de evidencia, sino que también contribuirá a una mejora extraordinaria en el sector forense, otorgando así una eficacia en la resolución de casos críticos, complejos de abuso sexual.

### 6. DESARROLLO

#### 6.1. Establecer la Proteína 3 isoforma 1

Para hallar la estructura de la Proteína 3 Isoforma 1 (*Homo Sapiens*) asociada a membrana del acrosoma espermático, la misma fue buscada en las bases de datos aportadas por la página del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A continuación, se describe la proteína, delimitando en rojo al región blanco de interés:

**NP\_776246.1**

FASTA:

**>NP\_776246.1 sperm acrosome membrane-associated protein 3 isoform 1  
[Homo sapiens]**

MVSALRGAPLIRVHSSPVSSPSVSGPRRLVSC LSSQSSALSQSGGGSTSAAGI  
EARSRALRRRWCPAGIMLLALVCLLSCLLPSE**AKLYGRCELARVLHDFGLDG**  
**YRGYSLADWVCLAYFTSGFNAAALDYEADGSTNNGIFQINSRRWCSNLTPNV**  
**PNVCRMYCSDLLNP NLKDTVICAMKITQEPQGLGYWEAWRHHCQGKDLTEW**  
**VDGCDF**

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

Nuestra proteína 3 isoforma 1 (*Homo Sapiens*), se encuentra asociada a las membranas del acrosoma espermático, la cual será nuestro antígeno de interés con el cual a posterior se desarrollará un anticuerpo de dominio único (sdAb), también conocido como anticuerpo de dominio, VHH o VNAR (*nanobodies*), que como ya se mencionó, es un tipo de fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Carece de la cadena ligera y del dominio CH de la cadena pesada que se encuentra en la región Fab convencional. Presenta un peso molecular de solo 12-15 kDa, es significativamente más pequeño que un anticuerpo de longitud completa (150-160 kDa) u otros fragmentos de anticuerpo como Fab (~50 kDa) y scFv (~25 kDa).

Seguidamente, se deberá realizar la marcación mediante un fluoróforo, como por ejemplo isotiocianato de fluoresceína verde (se observan con filtro FITC en un microscopio de fluorescencia), de la conjugación del antígeno-anticuerpo específico para cabezas de espermatozoides humanos.

### **6.2. Producción del anticuerpo de camélido complementario a la proteína específica seleccionada, fusionado a proteína fluorescente**

Para la producción del anticuerpo de dominio único (sdAb), el primer paso consiste en clonar el gen que codifica la Proteína 3 Isoforma 1 (*Homo Sapiens*) asociado a membrana del acrosoma espermático utilizando métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la clonación en vectores apropiados.

Una vez que se obtiene el antígeno, se inmunizan camellos o llamas para

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

generar anticuerpos específicos que reconozcan a esta proteína. Este enfoque, basado en la generación de anticuerpos mediante inmunización en animales, aprovecha sus características únicas para producir anticuerpos de alta afinidad.

Posteriormente, una vez completada la inmunización, se extrae el suero de los animales para evaluar la producción de anticuerpos contra la proteína 3, isoforma 1. Los mismos son analizados mediante ensayos como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) se utilizan para detectar y cuantificar estos anticuerpos, asegurando su eficacia y especificidad.

Para la producción masiva de los anticuerpos VHH, se debe realizar plásmidos de expresión de ADNc que codifican una o más proteínas de membrana de interés y otras proteínas coestimulantes para transfectar células de la piel, y el dominio extracelular de las proteínas de membrana se expone en la superficie de las células transfectadas. La inmunización repetida, impulsa la hipermutación somática y la maduración de la afinidad de los anticuerpos de cadena pesada específicos del objetivo.

La región codificante VHH/sdAb se amplificará por PCR a partir de células B obtenidas de sangre periférica o biopsias de ganglios linfáticos. Se debe seleccionar un sdAb específico mediante el cribado de presentación de fagos de anticuerpos de cadena pesada basados en sdAb expresados como proteínas secretoras en células HEK transfectadas.

El pequeño tamaño de los anticuerpos monodominio les permite entrar en contacto con epítomos a los que los anticuerpos tradicionales normalmente no tienen acceso, lo que los hace especialmente útiles para atacar a las proteínas de membrana. Las proteínas de membrana incrustadas en la bicapa lipídica de las

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

células desempeñan un papel importante en diversos procesos biológicos. Los anticuerpos monodominio pueden unirse a partes específicas de estas proteínas con alta afinidad y especificidad, lo que permite inhibir o alterar la función de las proteínas de forma dirigida.

### **a) Diseño de la construcción**

La construcción se basará en el vector de expresión pET28a, que es un vector de uso común para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

#### **Componentes de la construcción**

1. Vector de expresión: pET28a
2. Gen de interés: proteína 3 isoforma 1  
MVSALRGAPLIRVHSSPVSSPSVSGPRRLVSCLSSQSSALSQSGGGSTSA  
AGIEARSRALRRRWCPAGIMLLALVCLLSCLLPSSSEAKLYGRCELARVLHD  
FGLDGYRGYSLADWVCLAYFTSGFNAAALDYEADGSTNNGIFQINSRRWC  
SNLTPNVPNVCRMVCSDLLNPNLKDTVICAMKITQEPQGLGYWEAWRHHC  
QGKDLTEWVDGPDF
3. Promotor: T7
4. Enzimas de restricción: BamHI y HindIII.
5. Primer forward: CGCTTTGACATACCGGCGA
6. Primer reverse: AAAATCGCAGCCATCCATTCG
7. Etiqueta de histidina: 6xHis

#### **Pasos para la construcción del diseño**

1. Clonación del gen de interés: se clonará el gen de interés en el vector de expresión pET28a utilizando las enzimas de restricción BamHI y HindIII.
2. Inserción de la secuencia de inicio de traducción: se insertará la secuencia

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

de inicio de traducción antes del gen de interés (ATG).

3. Inserción de la etiqueta de histidina: se insertará la etiqueta de histidina 6xHis después del gen de interés.
4. Inserción de la secuencia de terminación de traducción: se insertará la secuencia de terminación de traducción (TAA) después de la etiqueta de histidina.

### **b) Secuencia de la construcción**

La secuencia de la construcción será la siguiente:

**pET28a-ATG-**

**MVSALRGAPLIRVHSSPVSSPSVSGPRRLVSCLSSQSSALSQSGGGSTSAAGIE  
ARSRALRRRWCPAGIMLLALVCLLSCLLPSSSEAKLYGRCELARVLHDFGLDGY  
RGYSLADWVCLAYFTSGFNAAALDYEADGSTNNGIFQINSRRWCSNLTPNVPN  
VCRMYSDLLNPNLKDTVICAMKITQEPQGLGYWEAWRHHCQGKDLTEWVDG  
CDF-6xHis-TAA**

### **c) Conversión a la Secuencia de Nucleótidos (ADN)**

Secuencia completa en codones de la porción de interés de la proteína 3 isoforma 1, optimizada para *E. coli*, indicando en color verde el sitio en el cual se adhiere el primer forward y en rojo el primer reverse:

**GCGAACTGTATGGCCGCT**GCGAACTGGCGCGCGTGCTGCATGATTTT  
GGCCTGGATGGCTATCGCGGCTATAGCCTGGCGGATTGGGTGTGCCTGGC  
GTATTTTACCAGCGGCTTTAACGCGGCGGCGCTGGATTATGAAGCGGATGG  
CAGCACCAACAACGGCATTTTTTCAGATTAACAGCCGCCGCTGGTGCAGCAA  
CCTGACCCCGAACGTGCCGAACGTGTGCCGCATGTATTGCAGCGATCTGCT

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

GAACCCGAACCTGAAAGATACCGTGATTTGCGCGATGAAAATTACCCAGGA  
ACCGCAGGGCCTGGGCTATTGGGAAGCGTGGCGCCATCATTGCCAGGGCA  
AAGATCTGACCGAATGGGTGGATGGCTGCGATTTT

### **d) Verificación de la construcción**

La construcción se verificará mediante secuenciación de ADN para asegurarse de que el gen de interés esté correctamente clonado y que la secuencia de la construcción sea correcta.

### **e) Expresión de la proteína recombinante**

La proteína recombinante se expresará en *E. coli* utilizando el sistema de expresión pET28a. La bacteria se cultivará en un medio de cultivo adecuado y se inducirá la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). La proteína se purificará utilizando una columna afinidad de histidina y se verificará su pureza y actividad mediante técnicas de laboratorio adecuadas.

### **f) Diseño de la construcción**

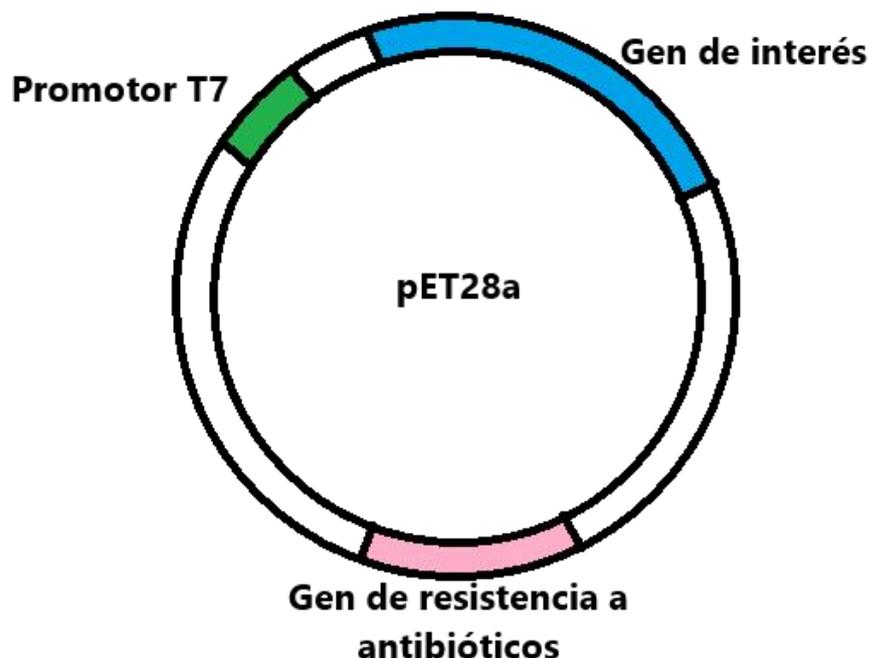
Se utiliza el promotor T7 para la adecuada expresión en *E. coli*.

#### **Diseño General de la Construcción**

1. Promotor T7
  - Secuencia del promotor: TAATACGACTCACTATAGGGe
2. Sitio de restricción (BamHI)

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

- Secuencia de BamHI: GGATCC
- 3. Secuencia de proteína (ya optimizada)
  - GCGAAACTGTATGGCCGCTGCGAACTGGCGCGCGTGCTGCATGATTTTGGCCTGGATGGCTAGCGGCTATAGCCTGGCGGATTGGGTGTGCCTGGCGTATTTTACCAGCGGCTTTAACGCGGGCGGGCTGGATTATGAAGCGGATGGCAGCACCAACAACGGCATTTCAGATTAACAGCCGCCGCGTGCAGCAACCTGACCCCGAACGTGCCGAACGTGTGCCGCATGTATTGCAGCGATCTGCTGAACCCGAACCTGAAAGATACCGTGATTTGCGCGATGAAAATTACCCAGGAACCGCAGGGCCTGGCTATTGGGAAGCGTGGCGCCATCATTGCCAGGGCAAAGATCTGACCGAATGGGTGGATGGCTGCGATTTT
- 4. 6xHis tag:
  - Secuencia para 6xHis: CATCACCATCACCATCACCATCAC.
- 5. Secuencia de terminación
  - Codón de terminación (TAA): TAA



## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

### 6.3. Componentes del *kit*

Nombre del *Kit* comercial: "Nano-Sperm"

#### **Soluciones proporcionadas en el *Kit***

- Solución fijadora: metanol.
- Solución de preparación de muestras: agua bidestilada.
- Solución bloqueadora: Caseína purificada.
- Solución para teñir la cabeza del espermatozoide: GFP verde (*Green Fluorescent Protein*)
- Solución de *buffer* de lavado: PBS de lavado 10X.
- Medios de montaje: portaobjeto con hoyuelo específico.

### 6.4. Protocolos

#### ❖ Preparación de soluciones por el Usuario

→ Solución *buffer* PBS de lavado 1X: Prepare solución 1x de lavado del stock 10x proporcionado, diluyendo 1:10 con agua bidestilada, es conveniente realizarlo en una botella y homogeneizar agitando.

→ Solución de preparación de muestras + DTT: para cada pocillo de muestra que se va a teñir, agregue 1uL de DTT 1 M a dos gotas de solución de preparación de muestra en un tubo de microcentrífuga y mezcle bien.

Nota: Realice la preparación de muestra + DTT diariamente antes de su uso

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

### **❖ Protocolo para obtención de muestra en soporte sólido**

Tiene como finalidad identificar y aislar el fluido seminal en casos de abuso sexual de soportes sólidos, como ser por ejemplo un preservativo, ropa interior de la víctima/agresor o hisopados extraídos de la persona damnificada. Estos luego se deben analizar en búsqueda de espermatozoides. Para estos casos, debemos recurrir a un procedimiento llamado levantamiento de evidencias en donde recuperamos los fluidos biológicos para estudio, para lo cual utilizamos el siguiente procedimiento:

- a) Observar el soporte sólido con luces forenses (UV) a distintas longitudes de onda.
- b) Identificar la zona en donde existe fluorescencia para determinar la ubicación del supuesto fluido biológico.
- c) Realizar sobre superficies sólidas un hisopado embebido en agua destilada o si se trata de prendas realizar un corte aprox. 3mm o 5mm.
- d) Agregar una porción del hisopo o de la prenda a un microtubo con 200uL de buffer de extracción.
- e) Agitar con un dispositivo Vortex por 30 segundos a mínima rpm.
- f) Centrifugue la muestra 8 minutos a 3.600 rpm.
- g) Eliminar el sobrenadante con una pipeta.
- h) Transferir el sedimento a una placa portaobjetos.
- i) Fijar la placa.

### **❖ Protocolo de uso del Kit Nano-Sperm**

- a) **Fijación:** agregar 2 gotas de solución fijadora a cada pocillo. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

- b) Lavado:** utilice una piseta de lavado para enjuagar suavemente cada pocillo de muestra con aproximadamente 2-3 ml de tampón de lavado 1x. No es necesario lavar ni enjuagar vigorosamente. Después del paso de lavado, use una esquina de una toalla de papel o una toallita de laboratorio para eliminar el tampón de lavado residual en el pocillo de la muestra.
- c) Preparación de la muestra:** Pipetear la solución de preparación de muestras preparada por el usuario + DTT a cada pocillo de muestra. Incubar durante 30 minutos.
- d) Lavar:** lavar el portaobjetos como se describe en el ítem b.
- e) Bloquear:** agregar 2 gotas de solución de bloqueo a cada pocillo de muestra e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- f) Lavar:** lavar el portaobjetos como se describe en el ítem b.
- g) Tinción:** agregar 2 gotas de solución de tinción a cada pocillo de muestra e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- h) Lavar:** lavar el portaobjetos como se describe en el ítem b.

### ❖ Visualización al microscopio

Con ayuda de un microscopio óptico de inmunofluorescencia, observar al mismo los portaobjetos teñidos utilizando los filtros adecuados. Los núcleos de las células, incluidos los epiteliales y los espermatozoides, se pueden visualizar utilizando filtros compatibles con DAPI. Las cabezas de esperma humano se pueden visualizar utilizando filtros compatibles con GFP (*Green Fluorescent Protein*) verde. Los portaobjetos se pueden observar con los aumentos 10x, 20x, 40x y 100x, a discreción del operador.

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

### 6.5. Consideraciones del *kit*:

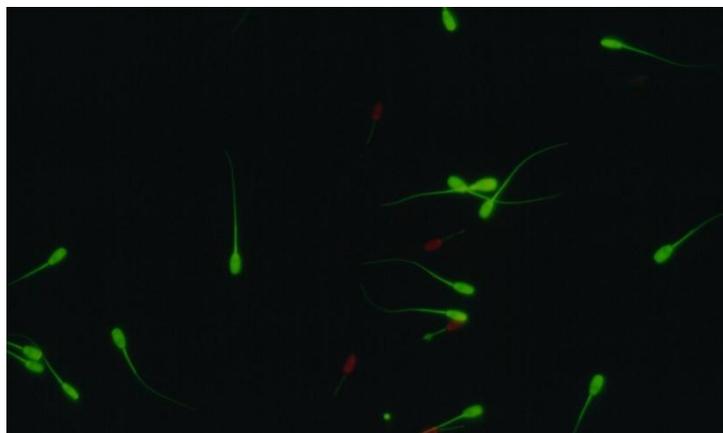
- **Especificidad:** *Nano-Sperm* es específico para identificar cabezas de espermatozoos humanos. No se espera que haya reactividad cruzada con células epiteliales, células sanguíneas o semen animal.
- **Sensibilidad de la prueba:** El límite de detección del *Nano-Sperm* fue diseñado para detectar un espermatozoide completo.

### 6.6. Análisis e interpretación de resultados

Una vez obtenida la muestra, montada en el portaobjeto y visualizada en un microscopio de inmunofluorescencia, con un aumento 40X, se recorre por campos la muestra hasta hallar células de interés forense.

#### Resultados posibles

- **Resultados positivos:** se visualizan células espermáticas en color verde, con un conteo mínimo de un espermatozoide completo para arribar a resultado positivo.



- **Resultados negativos:** No se visualizan células espermáticas.

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

### **6.7. Comparación con otros métodos:**

#### **➤ Métodos colorimétricos convencionales**

Los métodos colorimétricos de tinción con colorantes como el Giemsa o Eritrosina carecen de especificidad y sensibilidad, por lo que se requiere una amplia formación del analista para lograr la competencia necesaria en el examen microscópico de las pruebas de agresión sexual. La identificación de espermatozoides humanos en muestras difíciles con bajo recuento de espermatozoides, alta densidad de células epiteliales, mezclas de células y microorganismos de muestras rectales, degradación de los espermatozoides con desprendimiento de la cola de la cabeza, etc. puede ser extremadamente difícil y, a menudo, dar lugar a resultados negativos o no concluyentes.

#### **➤ SPERM HY-LITER**

Recientemente, se ha descrito otro método de tinción mediante fluorescencia específico de espermatozoides (*HY-LITER, Independent Forensics*) donde las cabezas y porciones de la cola se visualizan usando filtros compatibles con fluoresceína o *Alexa 488* por inmunodiagnos con marcaje diseñado mediante anticuerpos monoclonales.

*SPERM HY--LITER* fue desarrollado y validado para el análisis microscópico de espermatozoides humanos a partir de evidenciade agresión sexual. La especificidad de este método se obtiene a través de un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia (isotiocianato de fluoresceína verde – FITC) de *Alexa 488*, que se dirige específicamente a un antígeno en la membrana nuclear de las células espermáticas. Junto con la etiqueta *Alexa 488*, el colorante nuclear azul,

## DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA

4',6--diamidino-2-fenilindol (DAPI), también se incorpora como parte de la tinción.

En comparación, el Kit *Nano-Sperm* logra obtener resultados con alta especificidad para la identificación de células espermáticas, ello se debe a que los nanoanticuerpos al ser de menor tamaño y poseer mayor superficie de adherencia logran una marcación de la célula de interés teniendo un bajo porcentaje de resultados negativos.

### 8. BIBLIOGRAFÍA:

### 7. CRONOGRAMA DE TRABAJO

CRONOGRAMA DE TRABAJO	
OBJETIVOS ESPECIFICOS	TIEMPO ESTIMADO
1. Establecer a la proteína 3 isoforma 1 como blanco para hacer inmunohistoquímica para luego ser marcada, aislada y analizada.	3 meses
2. Producir un anticuerpo de camélido complementario a la proteína específica seleccionada, fusionado a una proteína fluorescente.	6 meses
3. Diseñar los diferentes componentes a utilizar en el kit.	3 meses
4. Desarrollar el protocolo para toma de muestra, análisis e interpretación de resultados.	3 meses
5. Comparar el Kit desarrollado con otras determinaciones y su especificidad.	3 meses

- ASECRIMF. (2011). ASECRIMF. Métodos De Reconocimiento, Identificación E Individualización De Manchas De Semen: <http://asecrimf.blogcindario.com/2011/01/00015-metodos-de-reconocimiento-identificacion-e-individualizacion-de-manchas-de-semen-i-parte.html>

- AYON, María Rosana. FGE, Manual De Procedimientos Del Laboratorio De Biología Forense, (2019). Fundación Miguel y Lillo. Tucumán Argentina. Pág. 22-29.

- Ello, R., & Ramírez, E. (2015). AEBM.ORG. Análisis Básico Del Semen: <http://www.aebm.org/jornadas/liquidos/LIQUIDO%20SEMINAL.pdf>

## **DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

- Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S. & Saerens, D. (2012). Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *The Journal of Biological Chemistry* , **287(3)**, 1970-1979. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242818>
- Henochowics, S. (2010). Elerginomista. (2010), de Antígeno Y Anticuerpo, Reacción Antígeno Anticuerpo: <http://www.elergonomista.com/biologiasselectividad/sb08.html>
- [https://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Herramienta bioinformática.
- <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>. Herramienta bioinformática.
- Jiménez, M. (2012). biblioteca. USAC. Asociación De Resultados Obtenidos En Análisis Para La Detección De Semen Y Espermatozoides: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3310.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3310.pdf)
- Martínez, P., & Vallejo, G. (2012). ELSEVIER. Recuperado el 31 de 03 de 2016, de Visualización Microscópica En Agresiones Sexuales: [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=90142772&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=285&ty=122&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=285v38n02a90142772pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=90142772&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=285&ty=122&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=285v38n02a90142772pdf001.pdf)
- MCA Abacus Diagnostics, I. (2008). ZOGBI. Recuperado el 12 de 04 de 2016, de PRUEBA Para Identificación Forense De Semen: <http://www.dczogbi.com/placas.html>
- Membrane Protein Specific Single Domain Antibody (SdAb) Discovery Service: <https://www.creative-biolabs.com/sdAb-Discovery-against-Membrane-Proteins-by-DNA-Immunization.html>
- Murcia, U. D. (2009). OCUM. Recuperado el 16 de 01 de 2016, de Microscopía Aplicada A Las Ciencias Forenses: <http://ocw.um.es/ciencias/microscopia-aplicada-a-lasciencias-forenses>
- Ortega-Portilla, Paola Andrea, Cancino-Villeda, Laura, Coronado-Aceves, Enrique Wenceslao, & Espitia-Pinzón, Clara. (2021). Nanoanticuerpos: desarrollo biotecnológico y aplicaciones. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 24, e398. Epub 17 de abril de 2023. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.398>
- Quispe, S., Guerra, S., & Solíz, R. (2009). Pesquisa Del Fluido Seminal En Víctimas De Violencia Sexual Por El Laboratorio Forense. Revista Médica La Paz, 3-4.



**DESARROLLO DE UN KIT DE INMUNOFLUORESCENCIA  
PARA DETECCIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS HUMANA**

• Siontorou, C. G. (2013). Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, **8**, 4215-4227. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S39428>.

• Stanfield, R. L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M. F. & Wilson, I. A. (2007). Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *Journal of Molecular Biology*, **367(2)**, 358-372. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.045>

• Velasquez, D. Luces Forenses (2012). PREZI. Recuperado el 20 de 10 de 2015. <https://prezi.com/wopkuii50ojv/luces-forenses/>