

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

TRAZABILIDAD MOLECULAR DE DOCUMENTOS

Krzywinski, Andrea Mariel – LU 131554

Lic. en Biotecnología

Sgherza, Francisco José – LU 119047

Lic. en Biotecnología

Tutor:

Prada, Federico, UADE

Co-Tutor:

Camara, María de los Milagros, UADE

Colaborador/es:

De Luca, Guido, UADE

Junio 2016



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Índice

Resumen	6
Abstract	8
Introducción	11
La importancia de identificar	12
Identificando objetos en la actualidad	12
Identificando personas: Historia de la biométrica	16
Los sistemas biométricos actuales	17
Comparación de los niveles de seguridad de los sistemas	20
Una alternativa biológica para la identificación de objetos	21
El ADN y su contexto histórico	22
La doble hélice	22
La trazabilidad molecular	24
La problemática	24
Diplomas y títulos en Argentina: Medidas de seguridad vigentes	25
Diplomas y títulos en Argentina: Niveles de seguridad	27
Antecedentes	29
El ADN como herramienta de identificación	30
Identificación y seguimiento de las civilizaciones: De África al resto del mundo	30
DNA <i>barcoding</i> aplicado al estudio taxonómico	31
Trazabilidad aplicada a la denominación de origen controlada	32
DNA <i>barcoding</i> artificial	32
Tintas con ADN	33
Empresas que ofrecen actualmente esta tecnología	33
Objetivos	35
Desarrollo	37
Introducción a la técnica	38
1° etapa: Asignación de ID	39
2° etapa: Cuestionamiento legal y validación	40
Intentos de vulnerar el sistema de IDs: casos particulares	42
Algoritmo de asignación	44

¿Qué es un algoritmo?	44
¿Cómo funciona el algoritmo de asignación?	45
Almacenamiento de IDs	45
Almacenamiento de secuencias asignadas	48
Generación de IDs	49
Materiales y métodos	53
Equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto.....	54
Material de vidrio y descartable	54
Preparación de medios de cultivo.....	54
Medio LB.....	54
Medio LB-Ampicilina	55
Medio SOB.....	55
Producción de stock de <i>E. Coli</i> Novablue	55
Bacterias competentes.....	56
Transformación bacteriana	56
Plásmidos utilizados	57
Técnicas analíticas de ácidos nucleicos.....	57
Extracción de ADN plasmídico - Miniprep.....	57
Extracción de ADN plasmídico – Midiprep.....	58
Precipitación de ADN plasmídico con etanol	58
Recuperación de ADN de soportes en papel.....	58
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	58
Electroforesis de ADN en gel de agarosa.	59
Amplificación/Cuantificación del ADN de trabajo - TOPO-GFP.....	60
Resultados	63
Selección del soporte	64
Recuperación del ADN.....	65
Ensayos de eficiencia de recuperación	65
Generación de IDs por PCR.....	68
Validación: Análisis molecular de la estampilla Revelado de IDs.....	70
Combinaciones de IDs	70
Discusión y conclusiones	75

Generalidades	76
Elección de soportes	77
El algoritmo de asignación e IDs de ADN como sistema de certificación y validación.	78
Inconvenientes con la estrategia original	79
Sistema de Clonados	79
Perspectivas a futuro.....	80
Diseño de la estampilla	80
Generación de los ID por medio de software	81
Aumentar la seguridad enmascarando los ID	81
Conclusiones	83
ANEXOS.....	85
Anexo I – Clonado.....	85
Digestión con enzimas de restricción.....	86
Doble digestión del vector pUC19 para clonado.....	88
Desfosforilación de extremos 5'	88
Inactivación de enzimas	88
Preparación del inserto	88
Ligación.....	90
ANEXO II – Diagrama de flujo del algoritmo de asignación	91
ANEXO III –Recuento en placa del proceso de determinación de soporte	93
Anexo IV – Marcadores	95
Referencias y citas bibliográficas.....	96

Resumen

Desde los albores de la humanidad la importancia de la identificación de objetos y personas fue creciente. Uno de los primeros métodos consistía en la impresión de las palmas de las manos en arcilla, o la descripción de una persona tras un comercio para indicar si es persona era, o no, de fiar. Con el tiempo los sistemas se volvieron más complejos y aparecía en la historia la identificación por huella dactilar, pero nuestra necesidad de llevar un orden y control de las cosas no era limitada a las personas, la identificación de objetos evolucionó desde las firmas y sellos a sistemas electrónicos más complejos que permitían una mayor seguridad, para objetos y personas. Esta evolución llegó a un punto en el que características biológicas comenzaron a ser aplicadas a la seguridad de objetos inanimados, y el ADN recombinante o sintético cobró un protagonismo mayor en un ámbito diferente al del laboratorio.

Ante la incesante aparición de documentos educativos falsificados, el Gobierno Nacional decidió, en los últimos años llevar adelante una serie de mejoras en materia de seguridad. Hasta el año 2009 la documentación contaba con firmas de las autoridades, papeles de composición específica para los certificados a fin de dificultar la impresión de títulos falsificados, e impresiones en relieve como medidas de certificación. En los últimos años se unificaron los formatos de los títulos y certificados analíticos de secundarios y terciarios; y en 2012, el proyecto SiCer implementó un sistema de códigos de barra y remitos electrónicos con el fin de complejizar los sistemas de certificación para los títulos universitarios.

Lamentablemente, el amplio acceso a internet no solo facilita una distribución del conocimiento (entre otras innumerables ventajas) sino que también, posibilita el libre comercio de documentación educativa. Debido a esta problemática, se buscó a nivel nacional complementar y reforzar la seguridad de la documentación mediante el diseño de un sistema basado en secuencias de ADN sintéticas, las cuales por ser invisibles y requerir, no solo secuencias específicas para revelarlas, sino además instalaciones y mano de obra calificada para lograrlo; otorgan un mayor nivel de seguridad.

En el marco de este proyecto, se desarrolló un algoritmo que permite asignar secuencias de ADN, de un tamaño específico, a un documento en base a datos presentes en el mismo. Se diseñaron las secuencias identificadoras (IDs) junto con sus primers específicos que luego de ser asignadas se colocan en el documento por medio de estampillas; y se

seleccionó el mejor soporte físico, entre los disponibles, para contener la identificación. Mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN embebido en las estampillas revela un amplicón de tamaño definido que indica la validez, o no, de un documento.

Como corolario de este desarrollo, realizado en el marco de nuestro PFI, se demostró la utilidad del ADN como estrategia robusta y fiable para la protección de documentos físicos, creando un sistema de validación de títulos a pequeña escala.

Abstract

Since the dawn of humanity the importance of identifying objects and people has been growing. One of the earliest methods for identification involved the printing of the palms of the hands on clay, or the assessment reliability based on the person conduct on trading to indicate if this person was or not reliable. Over time systems became more complex and the first fingerprint identification system appeared in history, but our need to bring order and control of things was not limited to people, identifying objects evolved from the signatures and seals to more complex electronic systems that allow greater safety for both, objects and people. This development came to a point where biological characteristics began to be applied to the security of inanimate objects, and recombinant, or synthetic, DNA gained greater prominence in different areas rather than the lab.

Given the incessant appearance of counterfeit educational documents, the national government decided in recent years to carry out a series of safety improvements. Until 2009 the documentation had signatures of the authorities, papers of specific composition for certificates to difficult the printing of counterfeit titles, and embossing as certification measures. In recent years the formats of diplomas and other certificates of secondary and tertiary were unified; and in 2012, the project SICer implemented a system of bar codes and electronic reference in order to complicate the certification systems for university degrees.

Unfortunately, the wide access to Internet not only facilitates distribution of knowledge (among countless other advantages) but also allows free trade in educational documentation. Because of this problem, we sought at a national level to complement and enhance the security of documents by designing a system based on synthetic DNA sequences, which by being invisible and requiring, not only specific sequences to reveal, but also facilities and skilled labor hand; provide a higher level of security.

As part of this project, an algorithm to assign DNA sequences of a specific size to a document, based on data present in the document was developed. The identifying sequences (IDs) were designed with their specific primers that after being assigned are placed in the document using stamps; and the best paper filter, from those available, was selected to contain the identifications. Using a polymerase chain reaction (PCR), DNA reveals embedded stamps amplicon defined size indicating the validity, or not, of a document.

As a corollary to this development, carried out within the framework of our PFI, the usefulness of DNA was demonstrated as robust and reliable strategy for the protection of physical documents, creating a small-scale validation system for titles.

Introducción

"La identificación humana lleva a la confianza mutua, la cual es esencial para el funcionamiento apropiado de la sociedad"

Biometrics of next generation

La importancia de identificar

Desde el comienzo de nuestras vidas una de las primeras cosas que hacemos es familiarizarnos con el rostro y la voz de quienes nos rodean, la identificación humana lleva a la confianza mutua, nos hace sentir seguros. La confianza y la seguridad son esenciales para el correcto desempeño y funcionamiento de la sociedad, es por eso que la identificación es uno de los aspectos fundamentales de la vida humana (Jain y Kuman; 2010). Conforme pasa el tiempo comenzamos a tomar conciencia de nuestro entorno y lo asociamos con seguridad, diversión y/o alimentación. A medida que nuestra percepción de las cosas se vuelve más compleja desarrollamos conciencia de pertenencia y comenzamos a identificar juguetes, y miembros de la familia como *nuestras cosas*. Sin duda, una de las primeras y más importantes cosas que hacemos desde el momento en que nacemos es identificar.

Desde el albor de las civilizaciones la importancia de identificar personas u objetos ha sido creciente. Los ejemplos más antiguos se remontan, por lo menos, a 31.000 años en el pasado, de la era de las cavernas. Junto a las pinturas rupestres encontradas en sus paredes, era común hallar huellas de mano las cuales podrían haber actuado como una "firma" de los autores. Tablas de arcilla que datan de 500 años antes de Cristo que se utilizaban para transacciones en babilonia incluían huellas dactilares. Ejemplos de reconocimiento utilizando descripciones físicas aparecen en la historia de un temprano y antiguo Egipto, donde se describían las características físicas de los comerciantes para diferenciar con quienes se habían realizado transacciones satisfactorias, o quienes eran nuevos o viejos dentro del mercado (*Biometrics History*, 2014).

Identificando objetos en la actualidad

La necesidad de identificar llevó a la creación de diferentes sistemas de identificación como la **firma** a mano alzada, la **numeración**, la identificación por **huella dactilar**, el uso de **códigos de barra**, las **imágenes latentes**, los **hologramas**, **cintas magnéticas**, los **RFID**, y la tecnología **NFC**.

La importancia de la identificación, ya sea para obtener un mayor orden en la sociedad o bien para lograr un control más estricto de objetos o situaciones cotidianas, es clara. A medida que las tecnologías se vuelven más complejas los niveles de seguridad para los sistemas de identificación aumentan también.

Actualmente los sistemas más utilizados para identificación de objetos son: los códigos de barra, la lectura óptica de caracteres (OCR), las bandas magnéticas, y las etiquetas RFID.

El **código de barra** es un sistema óptico legible a través de una máquina que representa información relacionada al objeto al que está asociado. Es un sistema que permite identificar automáticamente, por medio de una luz ya sea visible, invisible, o reflejada en un dibujo impreso, un objeto. Está conformado por un conjunto de barras y espacios de diferente grosor. Existen códigos de barra llamados lineales o de una dimensión y de dos dimensiones, estos últimos poseen longitud variable, poseen toda la información codificada en sí mismo sin requerir consultar una base. Su principal ventaja es que posee menor tasa de error respecto al ingreso manual de los códigos y la reducción de tiempos (Muller; 2005). Su aplicación se encuentra extendida prácticamente a cualquier tipo de actividad humana, tanto en industria, comercio, instituciones educativas, instituciones médicas, entre otros.



Figura 1. Código de barras. Conformado por un conjunto de barras y espacios de diferente grosor codifica información mediante las anchuras relativas de estos elementos. Al ser pasado por un láser las barras se reflejan y el código es decodificado.

El **reconocimiento óptico de caracteres**, comúnmente conocido como OCR, es un sistema utilizado de manera extensa desde 1970. Consta de números, letras y caracteres alfanuméricos con un estilo de letra estandarizado. Su funcionamiento es similar al del código de barras pues se iluminan los caracteres y al percibir su reflejo se decodifica (Muller; 2005). Las aplicaciones comunes incluyen fecha/rastreo de lote en empaques farmacéuticos o alimenticios, clasificación del correo y números de serie en la industria automotriz o electrónica. Su principal ventaja es que es un formato legible tanto de manera artificial como

de manera humana. No obstante, es un sistema que sufre errores de sustitución de caracteres, por lo tanto es muy sensible a la calidad de impresión (*Reconocimiento de Caracter Óptico (OCR)*; 2016).



Figura 2. Ejemplos de etiquetas o gravados de OCR. Se observa su aplicación en elementos electrónicos, medicamentos y piezas metálicas.

El sistema de **bandas magnéticas** consiste en partículas ferromagnéticas en una matriz de resina que se codifica polarizando dichas partículas, y permite la carga de un volumen relativamente alto de información (25 a 70 caracteres por pulgada). La lectura se realiza mediante inducción magnética (Muller; 2005). Sus principales ventajas son que es tecnología ampliamente establecida y aceptada, es legible a través de suciedad, su información puede modificarse y resulta ilegible para los seres humanos. Sus desventajas son la baja velocidad de lectura, en el caso de requerirse leer muchos artículos, y que la realización de una copia exacta de la tarjeta podría resultar indistinguible de la original para un lector. Posee una importante aplicación en el campo financiero, tarjetas de débito o crédito; identificaciones personales y en transporte, boletos de tren, avión, y subte.



Figura 3. Tarjeta magnética. La banda magnética se encuentra compuesta por pistas o tracks, su número es determinado por el ancho de la banda. Tienen capacidad para almacenar 80 caracteres por pista (*El "ABC" de la banda magnética* 2016)

El sistema **RFID** (Finkenzeller; 2010) trabaja enviando la información mediante ondas de radio, consta de un dispositivo de transporte de información el cual es muy similar a las tarjetas inteligentes. En el caso de los sistemas RFID la ventaja es que el intercambio de información no requiere un contacto entre el lector y el dispositivo que almacena la información, sino que ocurre mediante campos magnéticos. Además posee alta velocidad de lectura, es compleja su duplicación y reduce la mano de obra. Por otra parte, como desventaja se puede mencionar sus altos costos, interferencias y problemas de interacción con materiales líquidos o metálicos (Ahsan; 2010). Tiene aplicación en áreas como seguridad, librerías, aerolíneas, militar, deportes, y en animales (Ahsan; 2011).



Figura 4. Tag RFID. Dispositivo que puede ser adherido o incorporado a un producto, animal o persona con el propósito de transmitir la identidad del mismo.

Todos los seres vivos, incluyendo al hombre, también son blancos de dicha identificación. Para mantener cierto orden en la sociedad se requiere tener un registro claro y

distintivo de los individuos que la integran. A raíz de esto a lo largo de los años se han desarrollado e implementado diferentes sistemas basados en las características físicas de las personas.

Identificando personas: Historia de la biométrica

El término “biométrica” es derivado de las palabras griegas "bio" que significa vida, y "métrica" que significa medición. Durante miles de años la humanidad lleva reconociendo a sus pares por características físicas. Por ejemplo la voz, su apariencia, color de ojos, forma de la nariz e, inclusive, su forma de andar. No obstante, los negocios y las leyes han requerido grandes cambios al respecto. En otras palabras, la sociedad necesitó un cambio de paradigma en relación a los sistemas o métodos de identificación.

Durante el siglo XIX aparece el primer sistema biométrico con bases científicas de la mano de Alphonse Bertillon (1853-1914). Este criminólogo y antropólogo francés desarrolló un sistema antropométrico para el registro/reconocimiento de personas orientado a la identificación de criminales, basado en la medición de las diferentes partes del cuerpo. Este sistema, conocido como Bertillonaje o Signaletics, combinaba el uso de mediciones y fotografías. Las mediciones registradas eran provenientes del cuerpo, de la cabeza, la forma de las orejas, las cejas, y los ojos, entre los que se pudieron encontrar. El método también hacía uso de marcas distintivas de la persona como tatuajes, marcas de nacimiento e, incluso, características de la personalidad. Este sistema se mantuvo vigente durante casi tres décadas en los Estados Unidos y en Europa (*Visible Proofs: Forensic Views of the Body: Galleries: Biographies: Alphonse Bertillon (1853–1914)* 2016)

El sistema Bertillonaje funcionó bien hasta que en el año 1903 se pusieron en evidencia ciertas falencias con el caso de los "hermanos West". Dos criminales condenados en la misma penitenciaría, Will West y William West, poseían duplicación de medidas antropométricas, es decir medidas y apariencia casi idénticas. Esto dejaba expuesta la posibilidad de confundir a dos individuos mediante este sistema.

Además, el sistema Bertillon requería personal altamente capacitado, era poco preciso y el envejecimiento de los sujetos analizados producía modificaciones en las medidas conduciendo, en muchos casos, a resultados erróneos. La sumatoria de estas falencias condujo indefectiblemente al fracaso del sistema Bertillon. Por su parte, el caso de los hermanos West tuvo finalmente una solución al utilizar las huellas dactilares para su reconocimiento. Esta

estrategia fue vislumbrada por Sir Francis Galton y luego mejorada por el policía Croata, nacionalizado argentino, Juan Vucetich (Iván Vučetić) (1858-1925). De esta forma se demostró que era más confiable la ciencia de la identificación por huellas dactilares que el Bertillonaje (James Nordby, 2005) (*Visible Proofs: Forensic Views of the Body: Galleries: Biographies: Juan Vucetich (1858–1925)* 2016)

Los sistemas biométricos actuales

La biométrica ha escalado y comprende nuevas y diversas modalidades. Como requisito todas deben cumplimentar los siguientes lineamientos: ser distintivas y permanecer inalteradas con el paso del tiempo. Entre los sistemas biométricos más conocidos se encuentran la dactiloscopia, el reconocimiento facial, la impresión de la palma de la mano, el reconocimiento de la geometría de la mano y, el reconocimiento de voz (*Biometrics History* 2014).

La **dactiloscopia o análisis de huellas dactilares** es actualmente el método más popular y de mayor tiempo en uso, ya que se mantiene vigente desde el caso de los “hermanos West”. Esta técnica se basa en la comparación de características de la estructura de la huella, denominadas *minucias*, las cuales son puntos de interés que se encuentran en los patrones de las crestas papilares (altorrelieve) (**Figura 5**) (Jain *et al*; 1999).



Figura 5. Huella dactilar. Imagen del altorrelieve de la huella dactilar.

El reconocimiento de **impresión de la palma** de la mano humana es otro de los sistemas biométricos existentes. Se basa en la detección de patrones en la palma de la mano (**Figura 6**). Su importancia es creciente, aunque de momento el más utilizado sigue siendo el análisis de huellas dactilares. En varias oportunidades, a lo largo de la historia moderna, la impresión de las palmas de la mano se utilizó como una forma aceptable de identificación de personas analfabetas. El primer registro existente se remonta a 1858 cuando

Sir William Herschel registró las palmas de sus empleados en India en la parte trasera de un contrato para distinguir a quienes cobraban el sueldo el día de paga (Ashbaugh; 1999).



Figura 6. Impresión palma de la mano. Impresión de la palma de la mano de Konai un nativo de la India hecha por Sir W. J. Herschel en 1858 (Ashbaugh; 1999).

El **reconocimiento facial** desarrollado en la década de 1960, se basa en la distribución espacial básica de los diferentes elementos del rostro como la nariz, los ojos, la boca y el mentón. Este sistema de momento encuentra limitaciones relacionadas a la iluminación, gestos, maquillaje y variaciones de pose (**Figura 7**).

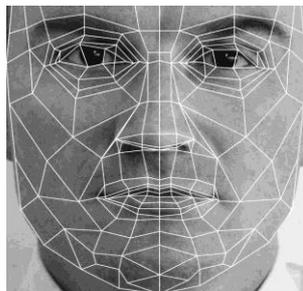


Figura 7. Reconocimiento facial. Gráficos creados sobre la imagen de la persona mostrando la relación de los diferentes elementos que componen su rostro.

El reconocimiento de la **geometría de la mano** utiliza imágenes de la mano para obtener información en base al largo de los dedos, ancho de la mano, superficie de la palma o perímetro (**Figura 8**). Transforma los datos en un modelo matemático que contrasta patrones con una base de datos. Estos sistemas utilizan un equipo demasiado grande por lo cual es más difícil incorporarlo a los sistemas de seguridad existentes.

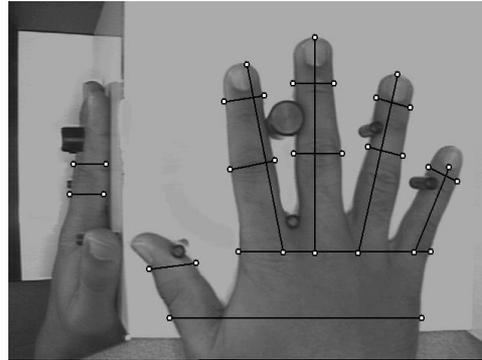


Figura 8. Geometría de una mano. Largo y ancho de los dedos y palma de la mano. Son los parámetros utilizados para la medición.

El sistema de **reconocimiento del iris** trabaja mediante un escaneo del ojo con luz infrarroja. Cuando la región del iris es obtenida bajo luz infrarroja presenta diferentes patrones de texturas complejas. Estos patrones, entre los cuales se encuentran rayas, fosos y relieves son particulares a cada individuo, algo similar a lo que ocurre con las huellas dactilares (**Figura 9**) (Wildes; 1997). Una de sus principales ventajas es que son difíciles de imitar, incluso quirúrgicamente. Asimismo, su principal desventaja es que los sensores son de un costo demasiado alto.



Figura 9. Diagrama y estructura del iris. El iris presenta surcos y relieves variados que permiten el reconocimiento y diferenciación de individuos.

El **reconocimiento de la voz** utiliza la voz del usuario como método de reconocimiento (**Figura 10**). Existen dos formas de este sistema: una dependiente de texto (modo limitado), la cual depende de una frase escrita para la validación por voz mediante la lectura de la misma. El otro método es independiente del texto. Ambos comparan las diferencias y similitudes en la voz del usuario contra los almacenados para decidir si existe coincidencia. No es recomendado para identificar entre un gran número de personas, debido a que comienza a dificultarse discernir entre ellas. En adición la forma de hablar puede verse

alterada por la edad, condiciones médicas y estados emocionales conduciendo a falsos positivos o negativos (Jain; 2008).

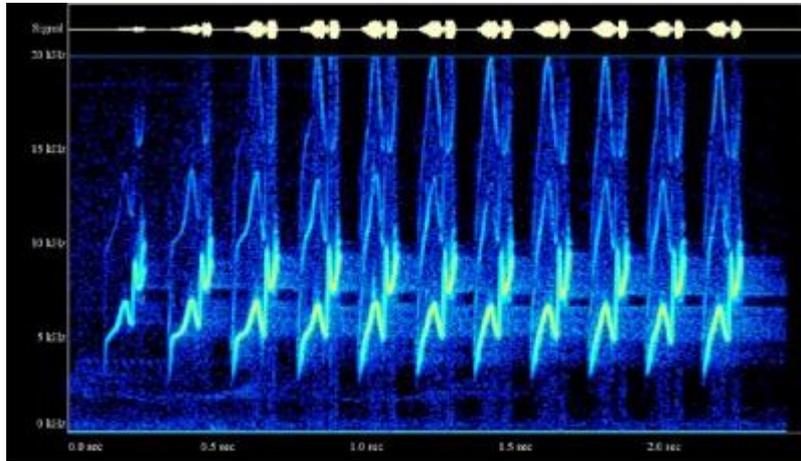


Figura 10. Perfil de voz. Señal producida por el registro de la voz para analizar su patrón.

El **ácido desoxirribonucleico (ADN)** también puede utilizarse como una herramienta de identificación de humanos y otros seres vivos. A excepción de los gemelos idénticos, cada individuo tendrá un patrón único e irrepetible. Mediante técnicas básicas de laboratorio es posible establecer relaciones filogenéticas con una certeza de 99.99%.

Comparación de los niveles de seguridad de los sistemas

Los sistemas descritos hasta ahora poseen distintos niveles de seguridad. Los sistemas de niveles inferiores, como por ejemplo la firma a mano alzada en el cuaderno de comunicaciones de un maestro a un alumno cumplirían su cometido; mientras que aplicaciones más sensibles, como por ejemplo un documento de propiedad, o información clasificada requieren de niveles de mayor complejidad. En la **Figura 11** se pueden ver los diferentes sistemas existentes y sus niveles de seguridad asociados.

Los sistemas de seguridad basados únicamente en caracteres alfanuméricos, son de fácil localización y acceso. La firma a mano alzada por ejemplo puede ser “fácilmente” copiada, vulnerando de esta forma cualquier documento que puedan estar resguardando. Los hologramas por el contrario presentan un nivel mayor de seguridad, a pesar de tratarse de algo visible su falsificación resulta mucho más difícil que otras medidas, como por ejemplo la firma a mano alzada. Las tintas sensibles a la luz presentan una mayor complejidad pues no se pueden ver a simple vista, pero el nivel que ofrecen de seguridad es menor que el del

holograma puesto de ejemplo. Por tratarse de una medida de seguridad invisible y que necesita una “llave molecular” para ser revelada, las tecnologías que utilizan ADN se encuentran en los escalones más altos en cuanto a medidas de seguridad.

Hay que tener en cuenta que por más alto que sea el nivel de seguridad utilizado siempre habrá quien intente encontrar una vulnerabilidad al sistema. Como reza el dicho criollo “hecha la ley, hecha la trampa”. Por dicha razón, a lo largo del todo el trabajo se hace énfasis en la importancia de aumentar, en la medida de lo posible, la complejidad de los elementos de certificación y/o validación.

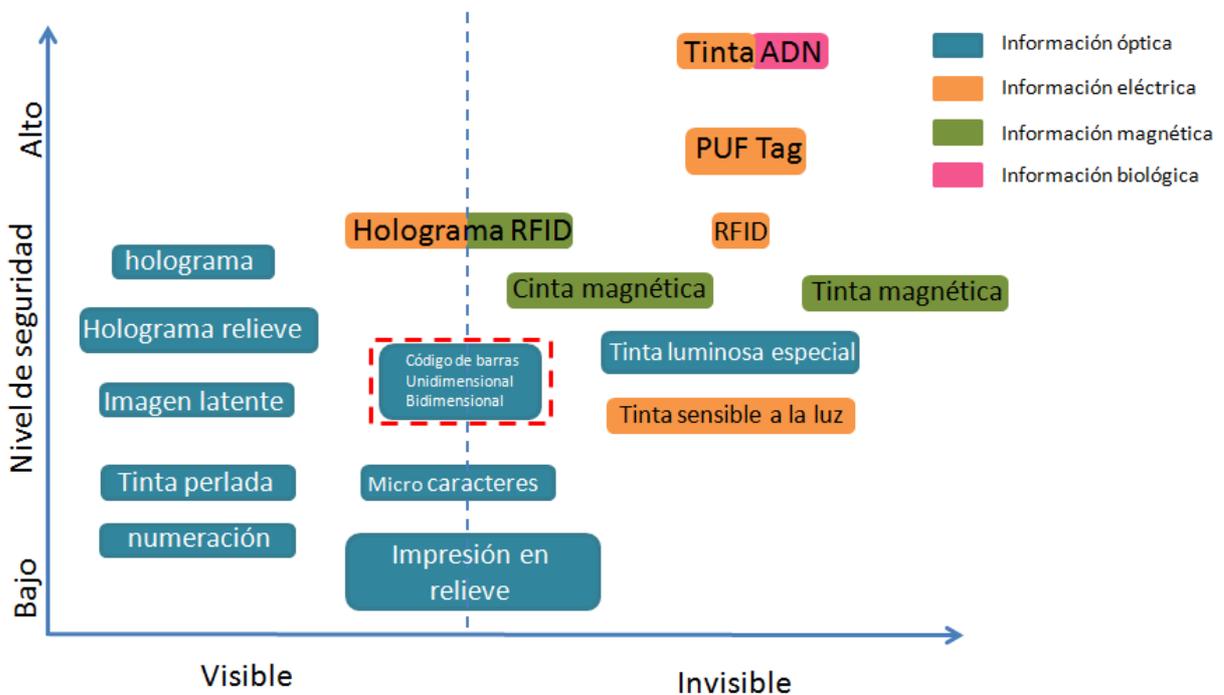


Figura 11. Comparación de productos de seguridad. Comparación de niveles de seguridad del sistema menos seguro al más seguro (Eje Y) considerando su nivel de visibilidad (Eje X) realizando una separación entre Visible e Invisible mediante una línea punteada central (Nissha.com, 2011).

Una alternativa biológica para la identificación de objetos

Con el fin de aumentar la complejidad en los sistemas, y basándose en la idea de utilizar características biológicas para la identificación de personas, surgió la idea de explotar macromoléculas biológicas para **aplicaciones no biológicas**. En este momento entra en escena el ADN como **elemento identificador**. Su carácter de macromolécula permite aumentar la seguridad significativamente pues resulta invisible al ojo humano desnudo y, al

mismo tiempo, tiene la particularidad de poder ser “revelado” mediante amplificación de forma específica, en regiones particulares y de tamaños particulares.

El ADN y su contexto histórico

La doble hélice

En la década de 1940 dos importantes eventos tuvieron lugar. El primero fue el descubrimiento de que la información genética consta básicamente de las instrucciones para la producción de proteínas, macromoléculas necesarias para las funciones fundamentales de las células. El segundo evento fue la identificación del portador de la información, el **ácido desoxirribonucleico** (ADN) (Watson; 1968). De todas formas no fue hasta 1953 que James D. Watson y Sir Francis Crick descubrieron la estructura de la doble hélice (**Figura 12**), lo que permitió, años más tarde, responder cómo la información en el ADN es copiada para ser transmitida a las células hijas. Este importante descubrimiento arrojó los primeros indicios de como el ADN lleva codificadas las instrucciones para la síntesis de las proteínas.

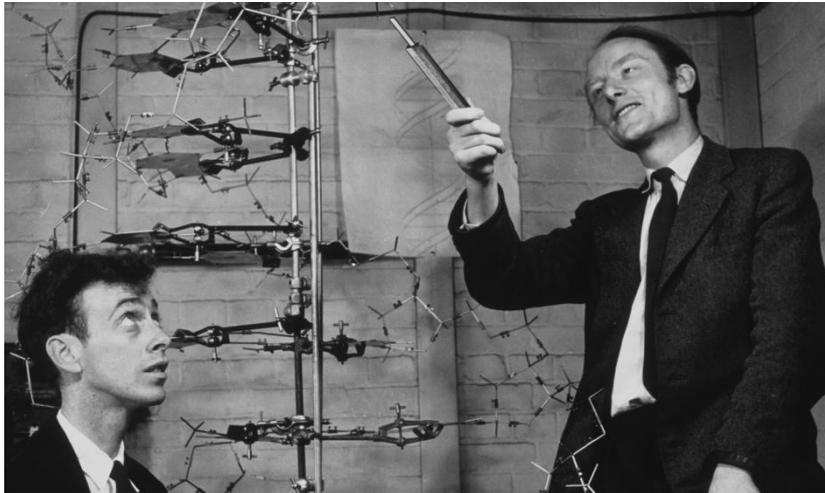


Figura 12. Foto de James Watson y Francis Crick con su modelo de ADN en los Laboratorios Cavendish en 1953. James Watson (izquierda) y Sir Francis Crick (derecha) posando junto a su modelo de la doble hélice de ADN en los laboratorios Cavendish (Foto de A. Barrington Brown).

La doble hélice del ADN se encuentran conformada por un *backbone* de enlaces fosfato/azúcar con sentido 5'- 3' del cual una combinación de cuatro bases nitrogenadas protruyen formando en conjunto una serie de polinucleotidos. Las cuatro bases en cuestión son adenina, timina, guanina y citocina. Cada hebra de ADN no es idéntica a la

otra en secuencia sino que son complementarias entre sí. La presencia de una guanina en una hebra implica la presencia de una citocina en la otra, mientras que la presencia de una adenina en una hebra implica la presencia de timina en la otra para su apareamiento. Apareadas las bases se apilan una sobre la otra (*Stacking*) (**Figura 13**).

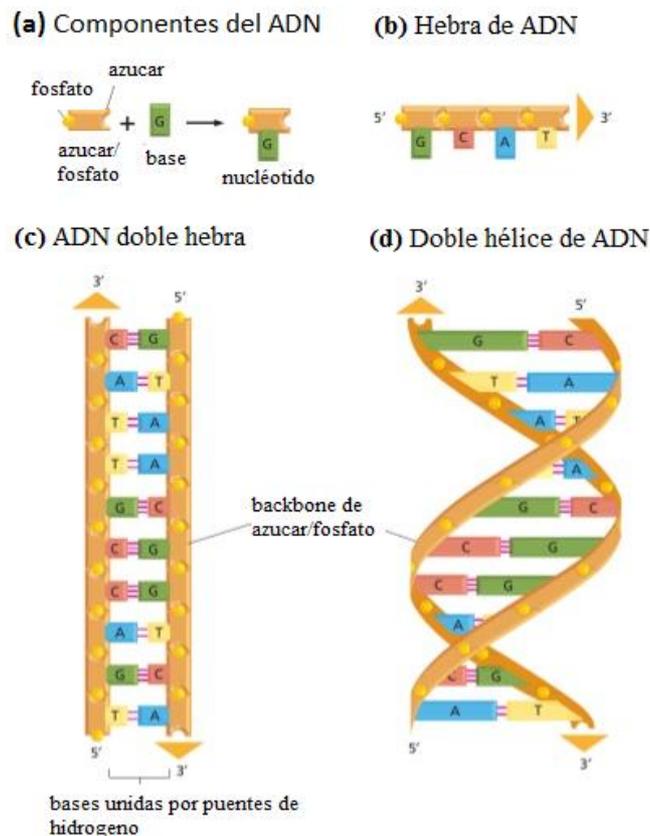


Figura 13. Estructura del ADN. La doble hélice mantiene siempre el mismo ancho, pues las purinas siempre enfrentan a las pirimidinas en los pares de base A-T y G-C. (a) El ADN se encuentra conformado por cuatro tipos de nucleótidos, cada nucleótido está conformado por una base unida covalentemente a un azúcar/fosfato. (b) Los nucleótidos se unen covalentemente para formar una cadena polinucleotídica, con un esqueleto de azúcar/fosfato del que protruyen las bases. (c) Una molécula de ADN está compuesta de dos cadenas polinucleotídicas (hebras de ADN) unidas por puentes de hidrogeno entre bases apareadas. (d) Las hebras de ADN apareadas forman la estructura de doble hélice (Alberts, 2004).

Para mantener la estructura dilucidada por Watson y Crick es necesario que ambas hebras corran de forma opuesta una con la otra, es decir que la doble hélice es anti paralela. Cuando una hebra corra en sentido, por ejemplo 5'- 3', la otra correrá en sentido opuesto, 3' - 5'. A lo largo de la cadena el *backbone* de azúcar/fosfato se mantiene siempre mirando hacia el exterior mientras que las bases protruyen hacia el centro (Lewin; 2000).

En el marco del estudio teórico de este trabajo de tesis se encontró que existen diferentes aplicaciones del ADN para seguimiento o identificación, y se las llamó, entre otras, **DNA barcoding**. En la sección *Una alternativa biológica para la identificación de objetos* se mencionó el uso del ADN con aplicaciones no biológicas, es decir explotando sus características moleculares intrínsecas para usos no relacionados con la vida, en el marco de este proyecto se utiliza como medio para crear un sistema de trazabilidad.

La trazabilidad molecular

¿Qué es la trazabilidad? De acuerdo a la **Real Academia Española (RAE)**, la trazabilidad o “rastreadabilidad” es *la posibilidad de rastrear el camino seguido por un producto comercial desde su origen hasta su destino final, así como el registro de todos los datos que permiten realizar dicho seguimiento (...)*. Se puede decir que la trazabilidad es, en realidad, un sistema que comprende varias disciplinas que permiten conocer la historia, ubicación y trayectoria de un producto mediante las herramientas de seguimiento apropiadas. Todo sistema de seguimiento debe tener una forma de identificar el objeto, de capturar los datos con los que se identifica y un programa o *software* que pueda administrar esos datos.

En varios trabajos científicos, algunos de los cuales serán mencionados en esta tesis, se aborda la trazabilidad por medio de moléculas. No obstante, no hay una definición clara del concepto como **trazabilidad molecular**. En varias oportunidades se menciona de forma indirecta pero, hasta donde se pudo investigar, aún no fue definido. Lo que se puede asegurar es que, en esencia, sigue los mismos lineamientos de lo que tradicionalmente se conoce como trazabilidad, con la diferencia de que se utilizan moléculas como medios para la identificación permitiendo esclarecer el origen de determinados elementos. Trascendiendo fronteras, la identificación por medio de características físicas, o incluso biológicas, no permaneció como algo exclusivo de los seres humanos, animales y plantas sino que comenzaron a implementarse también en objetos inanimados.

La problemática

A lo largo de los últimos años, en Argentina, fueron detenidos múltiples grupos que se dedicaban a falsificar títulos académicos y certificados analíticos. A raíz de esto, el estado estableció una fuerte línea de trabajo con el fin de hacer frente a la problemática de la

venta de títulos falsificados. Para tal fin se implementaron nuevas medidas, con foco en la tecnología, para reforzar el entorno legal y disminuir el delito.

Diplomas y títulos en Argentina: Medidas de seguridad vigentes

Como medida para mitigar este problema se implementó en el año 2009 una reforma para aumentar la seguridad en los títulos secundarios y terciarios. Según la Resolución CFE N° 59/08, aprobada el 29 de Mayo de 2008 el Ministerio de Educación de la Nación elaboró un *Proyecto de Resguardo Documental de los Títulos y Certificaciones de Estudios correspondientes a la finalización de la Educación Secundaria y de la Educación Superior*, buscando fortalecer la confiabilidad de la documentación educativa en tiempos donde muchos títulos y certificados analíticos son falsificados. Se establecieron medidas de seguridad y se unificó el formato de la documentación educativa a nivel nacional resaltando así la necesidad de las mejoras en esta materia. La casa de la moneda fue asignada al diseño y emisión del papel en el que se confeccionaron los certificados para concretar la unificación del formato a nivel Nación.

A pesar de las medidas tomadas con fines disuasorios, las falsificaciones de documentación educativa no cesaron. Siguiendo adelante con la línea de trabajo del *Sistema Federal de Títulos* se procedió a mejorar los Títulos Universitarios, la Dirección Nacional de Gestión Universitaria (DNGU) decidió implementar nuevas medidas que llevaron a la creación del Sistema Informático de Certificaciones (SICer) (**Figura 14**), puesto en marcha en 2012.

El SICer trabaja emitiendo un código de barras asociado al documento universitario a validar, junto con un remito electrónico también asociado a este documento. Una base de datos pública almacena la información de todo aquel que se haya recibido y se encuentre registrado en el sistema.

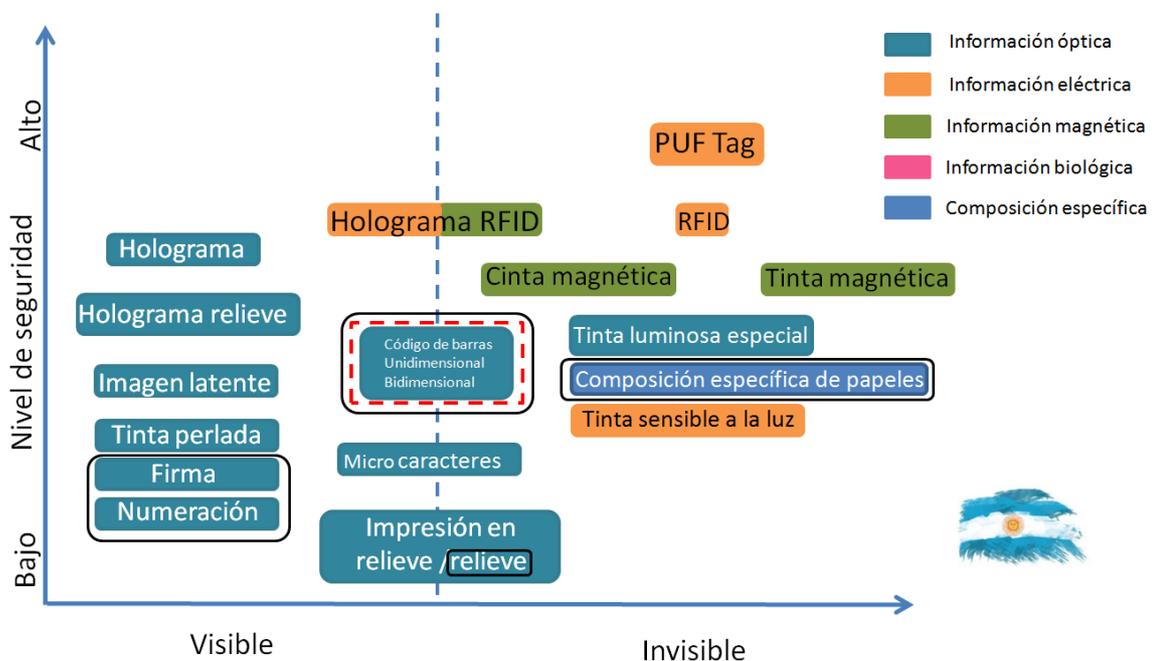


Figura 14. Sistema SICer. ME: Ministerio de Educación. DNGU: Dirección Nacional de Gestión Universitaria (1) La institución que emite el certificado procede a la carga de un remito. (2) La institución que emite el certificado genera una etiqueta de código de barras. Los certificados son identificados con sus respectivos códigos. (3) La DNGU recibe el remito y la documentación pertinente. (4-5) La DNGU pega la oblea de seguridad asociada ahora al remito que la universidad cargó. (Portales.educacion.gov.ar, 2012)

A pesar de los esfuerzos de las autoridades por eliminar o disminuir la actividad de los falsificadores, la venta de documentación educativa continúa. En el año 2011 un joven de 21 años fue detenido por la venta de títulos universitarios por internet (Noticia del diario Clarín; 2011). Este caso no fue el primero ni el último, por citar otros ejemplos en los últimos años varias páginas de internet se han sumado a esta actividad, incluyendo perfiles/páginas de *Facebook* que ofrecen abiertamente la venta de títulos universitarios de varias instituciones educativas. Un perfil, presuntamente de Lima, Perú ofrece títulos universitarios para toda Latinoamérica. En el portal “*Taringa*” se puede encontrar un *thread* en el cual se ofrecen, de igual manera, títulos de la Universidad de Buenos Aires con costos desde los \$30.000. Otros sitios ofrecen “servicios” similares. Resulta visible que la falsificación de títulos educativos es una problemática vigente detectada en varios países.

Diplomas y títulos en Argentina: Niveles de seguridad

Las medidas de seguridad que poseen actualmente los documentos educativos Argentinos son firmas, relieves, códigos de barra y papel de composición específica. Los primeros dos son sistemas que se encuentran en una gama baja/media de seguridad y son visibles, por otra parte el papel de composición específica le otorga a los títulos de cada institución un grado mayor de seguridad. Sin embargo, las tecnologías que se basan en el ADN ofrecen niveles mucho mayores de seguridad, en primer lugar por ser estas invisibles al ojo humano desnudo y en segundo lugar por ser de difícil acceso, copiado o revelado (**Figura 15**).



Editado para el proyecto del cuadro original de "Nissha Develops New Printing System with Plant DNA Ink. June 23, 2011" Nissha Printing Co., Ltd.

Figura 15. Comparación de productos de seguridad en la documentación educativa Argentina. El cuadro fue editado para fines ilustrativos del cuadro original presentado previamente del trabajo de Nissha .Ltd Las medidas presentes en los documentos educativos en Argentina, sean obleas, firmas, o códigos de barra, son medidas de información óptica y presentan niveles de seguridad mucho más bajos que las tecnologías que incorporan ADN. Estas confieren niveles más altos de seguridad, en el caso de las Tintas con ADN la tinta funciona como *carrier* del mismo y sus estabilizantes. En este trabajo el ADN se aloja en una estampilla que se coloca en el documento.

Este avance tecnológico no reemplaza sino que funciona como un complemento de los sistemas actualmente utilizados. En otras palabras se añade un escalón

más a los niveles de seguridad disponibles para certificación y validación de documentos de información sensible o alto interés.

Este sistema puede ser perfectamente aplicado a títulos universitarios, títulos de propiedad, registro de armas, documentos de identidad (DNI, pasaportes, etc), entre otros documentos de valor. Si bien el proyecto *Trazabilidad molecular de documentos* posee un amplio espectro de aplicación, se decidió hacer foco en los títulos universitarios.

Antecedentes

"It is strange model and embodies several unusual features. However, since DNA is an unusual substance, we are not hesitant in being bold"¹

James D. Watson - *The double helix* 1968

El ADN como herramienta de identificación

El ADN puede ser utilizado como una poderosa herramienta de identificación. Uno de los ejemplos más contundentes es el seguimiento geográfico y filogenético de nuestra especie hasta la cuna misma de la humanidad. Asimismo, el ADN también puede ser clave como parte de una estrategia para la identificación y seguimiento de alimentos, objetos e incluso individuos.

Identificación y seguimiento de las civilizaciones: De África al resto del mundo

La secuenciación del genoma humano fue uno de los eventos científicos y sociales más importantes del nuevo milenio, dando origen a la era post-genómica. Dicha revolución trajo aparejadas nuevas herramientas que permitieron un estudio detallado de la historia de la humanidad, pudiendo rastrearse, a pesar de las diferencias fenotípicas, el origen de las primeras civilizaciones (Yudell *et al.* 2002). El seguimiento de nuestra especie hasta sus orígenes fue realizado mediante el estudio de las variaciones en las mutaciones del **ADN mitocondrial** (aportado sólo por la madre) y del **cromosoma Y** del hombre (aportado sólo por el padre). Esto es posible ya que el ADN mitocondrial no es "víctima" de recombinación por lo que guarda las mutaciones acumuladas pudiendo ser utilizado como un verdadero reloj molecular (Wallace *et al.*; 1999). Por su parte, el cromosoma Y sufre eventos de recombinación pero solo en los extremos, conservando una zona apta para la búsqueda de mutaciones.

Cada mutación detectada crea un nuevo haplogrupo. Todos los miembros de un haplogrupo remontan su ascendencia a un solo individuo, el primero en presentar la

¹*"Es un extraño modelo y porta varias características inusuales. Sin embargo, como el ADN es una sustancia inusual no dudamos en ser audaces"* (Traducción propia)

mutación. Cabe destacar que se define haplogrupo como el término utilizado para describir ramas individuales o grupos de ramas cercanas del árbol genético de todos los humanos.

El estudio de Yudell *et al* comparó 39 secuencias completas de ADN mitocondrial provenientes de África, Asia y Europa. El análisis filogenético comparativo de estas secuencias demostró que estas pertenecen a un mismo árbol que diverge en diferentes haplogrupos o ramas.

El seguimiento del cromosoma Y, una molécula lineal de 60 megabases aproximadamente, denotó su raíz filogenética en África de forma similar al ADN mitocondrial. Un análisis de los grupos y subgrupos del árbol permitió realizar el seguimiento de la migración de las civilizaciones desde África al resto del mundo.

DNA *barcoding* aplicado al estudio taxonómico

En 2003 Paul Hebert de la Universidad de Guelph (Ontario, Canadá) propuso la clasificación y caracterización de organismos vivientes basada en **DNA *barcoding***. Este sistema permite identificar a que especie pertenece un espécimen biológico utilizando una secuencia corta de ADN de una región estandarizada que es comparada a una secuencia de referencia. Complementa la forma clásica de clasificación linneana de organismos a partir de su forma, tamaño, color y comportamiento. Es útil para identificar en situaciones donde no es fácilmente asequible guiarse por medio de la morfología como ser: estadios tempranos de desarrollo y alimentos procesados (trazabilidad alimentaria), donde una pequeña porción de tejido permite realizar el análisis por *DNA barcoding*.

Para el *DNA barcoding* se eligió trabajar con ADN mitocondrial, en detrimento del ADN genómico, debido a que este carece de intrones, prácticamente no sufre recombinación y se hereda de forma haploide (Saccone *et al.*; 1999).

Existen dos características fundamentales para elegir que utilizar como *barcode* ideal. La primera es que posea **alta resolución**, es decir capacidad de distinguir entre dos organismos muy similares, y la segunda una **alta cobertura taxonómica**, que sea posible cubrir un amplio espectro de organismos (Hebert *et al*; 2003b). Siguiendo estos criterios el gen seleccionado para *DNA barcoding* fue el CO1 (Cytocromo C oxidasa), por encontrarse en la mayoría de los organismos, como ser aves, mariposas, moscas, y peces, es muy útil para identificación. Por el contrario, este gen no resultó un buen *barcode* en plantas por su lenta evolución y baja acumulación de mutaciones careciendo de resolución, por ello se

seleccionaron dos regiones génicas de los cloroplastos (matK y rbcL) (Barcodeoflife.com, 2016).

Trazabilidad aplicada a la denominación de origen controlada

La Denominación de Origen Controlada (DOC) es un tipo de indicación geográfica para productos agrícolas/alimenticios, y los productores que se acogen a esta denominación aseguran los más altos estándares de calidad, así mismo aseguran usos tradicionales en la producción, como por ejemplo el uso de una cepa de uva determinada para un vino tradicional de una región.

La trazabilidad molecular permite asegurar la DOC pues es posible saber si las condiciones son cumplidas. Por ejemplo, por análisis de SNPs (alelos de único nucleótido) es posible determinar si la cepa de la uva es verdaderamente la utilizada para una producción determinada. Esta tecnología resulta muy útil a la hora de proteger productos de alta calidad, tales como el aceite de oliva, diferentes especies de peces, maderas, carnes vacunas, etc. Actualmente, la Unión Europea busca mejorar e impulsar la trazabilidad tanto de los animales como de sus productos asegurando la Indicación Geográfica Protegida (IGP), y la DOC (Nicoloso *et al*; 2013).

DNA *barcoding* artificial

El *DNA barcoding artificial* se define como un “marcador genético artificial y silencioso”. Dicho marcador es introducido en el genoma por lo cual es heredable, como es abierto a la lectura, es decir no es un código oculto, puede ser leído por cualquier persona idónea y, a su vez, está diseñado de forma que no produce interferencias a nivel génico ni es expresado.

En un estudio realizado para el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE) denominado JASON se analizó la factibilidad de marcar los microorganismos destinados a biorremediación (Block *et al*; 2004). En dicho estudio el concepto de *DNA barcoding* difiere del que había establecido Hebert, planteando que es un marcador genético silencioso que consiste de un segmento corto diseñado. A este concepto le añade los de DNA *Watermarking*, y los *Tags de ADN*.

El concepto de *DNA watermarking* es similar al de *DNA barcoding artificial* con la diferencia de que no se encuentra abierto a la lectura. La tecnología implica o requiere

de un conocimiento específico para saber dónde está insertada la secuencia, para lograr leerla, ya que se encuentra distribuida a lo largo del genoma. Las secuencias que se integran en el genoma funcionan como *watermark* sin influir en el marco de lectura, ni la regulación de la expresión génica del genoma intervenido (Barnekow *et al*; 2008). Esta tecnología se utiliza para identificar el uso desautorizado de organismos genéticamente modificados (GMO).

Por su parte, en el *DNA tagging* los *tags* se componen de secuencias exógenas de ADN y no son heredables. Las mismas se terminan perdiendo, degradando o diluyendo por falta de una presión de selección.

Tintas con ADN

Masaki Hayashida (Hashayida; 2004) del departamento de salud pública y medicina forense de Sendai, Japón, desarrolló un sistema de autenticación por medio de tintas mezcladas con ADN. Estas *Biometric DNA Ink*, contienen ADN simple cadena sintético. Las identificaciones se consiguen de la siguiente manera: En primer lugar se genera una identificación personal en base al número de *Short tandem repeats* (STR) en el locus (se genera un DNA-ID). Como segundo paso el DNA-ID es encriptado usando un algoritmo que permite proteger la privacidad (función *hash*). Finalmente la serie generada se transforma en una secuencia de pares de bases y posteriormente a doble cadena para evitar su degradación.

Otro sistema que utiliza una mezcla de tinta con ADN es el desarrollado por Nissha Prints Co. LTD patentado por *Applied DNA Sciences*, que será descrito en *Empresas que utilizan actualmente esta tecnología*, donde se utiliza ADN vegetal para la creación de un código de barras genético el cual se imprime en los objetos a validar.

De los conceptos hallados y desarrollados durante el estudio del estado del arte en el uso de moléculas para trazabilidad, el que más se asemeja al desarrollo planteado en este trabajo es el de *Tintas con ADN*.

Empresas que ofrecen actualmente esta tecnología

La aparición de empresas dedicadas a la seguridad que emplean moléculas de ADN denota la importancia de desarrollo en este campo. La empresa *Applied DNA Sciences* utiliza ADN vegetal en los ámbitos de protección de marcas; marcaje de elementos personales, textiles, dinero y objetos en tránsito y protección anti vandalismo. Entre los servicios que ofrecen, se puede encontrar sistemas que utilizan secuencias que para identificar

el producto, y un *spray* para marcar delincuentes, que contiene ADN combinado con una tinta visible solo al exponerla a luz UV. El *spray* se instala en el recinto a proteger, y se acciona cuando se activa una alarma de seguridad, disparando el mismo sobre el perpetrador. Posteriormente, por medio de exposición a luz UV se hace un screening rápido del criminal y luego se analiza el ADN que lo marcó para asociarlo a la escena del crimen.

Otras empresas, como *Selecta DNA*, ofrecen medidas de seguridad anti robo de cobre, robo de bienes, protección de establecimientos y domicilios y anti falsificaciones por medio de ADN sintético. Al igual que *Applied DNA Sciences* permite el marcaje de perpetradores, el ADN sintético permanecerá en los delincuentes durante semanas ya que se aferra a las fibras y permanece entre los pliegues de la piel.

Las medidas de seguridad que contienen información biológica son de por sí más difíciles de vulnerar. Como se vio en la (**Figura 15**) las tecnologías con ADN se encuentran en un escalón muy superior de seguridad pues para acceder a la identificación es necesario, no sólo conocer en qué lugar del objeto se encuentra el identificador sino además con que será revelado el código.

A pesar de las medidas tomadas por el gobierno Nacional para combatir la venta de títulos, hasta el momento de las correcciones finales de este trabajo las noticias sobre estos hechos se encuentran vigentes. El SICer es una herramienta importante y poderosa en esta lucha, pero no es suficiente para dejar en jaque a los delincuentes. Es necesario dar un paso más en materia de seguridad, y el ADN puede cumplir ampliamente con esa tarea. Hasta ahora las empresas que se dedican a ofrecer servicios con ADN se encuentran en el exterior y están orientadas a la protección de comercios u objetos, pero ninguna aplica este tipo de protección a los documentos educativos.

Objetivos

Este proyecto tiene como objetivo desarrollar un sistema de certificación/validación basado en secuencias sintéticas de ADN, que permitan incrementar la complejidad de los sistemas de seguridad rutinariamente utilizados para proteger la documentación educativa.

Para alcanzar el objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar un algoritmo capaz de vincular documentos en formato texto con secuencias de ADN preestablecidas o sintetizadas.
- Diseñar el sistema de certificación/identificación.
- Diseñar los oligonucleótidos y las estrategias de clonado para la construcción de las secuencias identificadoras.
- Evaluar y determinar el mejor soporte físico para el ADN identificador (ID).
- Validar mediante PCR las identificaciones de ADN.

Desarrollo

Introducción a la técnica

Este apartado está compuesto por varias secciones, las que permitirán realizar un recorrido global a través del sistema para comprender su funcionamiento.

El sistema de certificación propuesto en este proyecto consiste en asociar secuencias de ADN prediseñadas, que funcionan como identificadores, a los documentos a proteger de posible plagio. La asignación de dichas secuencias se realiza a través de un programa que se alimenta de datos presentes en el título a certificar (**Figura 18**), respaldando el proceso con el almacenamiento en una base de datos.

La asociación de las secuencias identificadoras (ID) se realiza mediante el algoritmo de asignación, que nutriéndose de datos pertenecientes al documento, genera un vínculo entre el título a certificar y una **secuencia x** almacenada en la base de datos. Se almacena el usuario al que se certificó junto con la/las secuencias ID que le corresponden, el par de primer que amplifica el ID y el tamaño de amplicón que servirá como identificación.

El ADN se anexa al documento por medio de estampillas que contienen embebido el/los plásmidos que portan la identificación. La estampilla de papel absorbente de celulosa de alta pureza, funciona como soporte sólido del ADN identificador.

El documento estampillado con este proceso puede ser sometido al escrutinio legal por parte de un particular, empresa o institución, para corroborar su validez. En dicho caso, el documento deberá ser enviado al lugar en el que fue certificado para realizar el análisis molecular de la estampilla. El ADN recuperado será sometido a análisis por medio de una PCR y el tamaño del amplicón resultante comparado con la información almacenada en la base de datos (**Figura 16**).

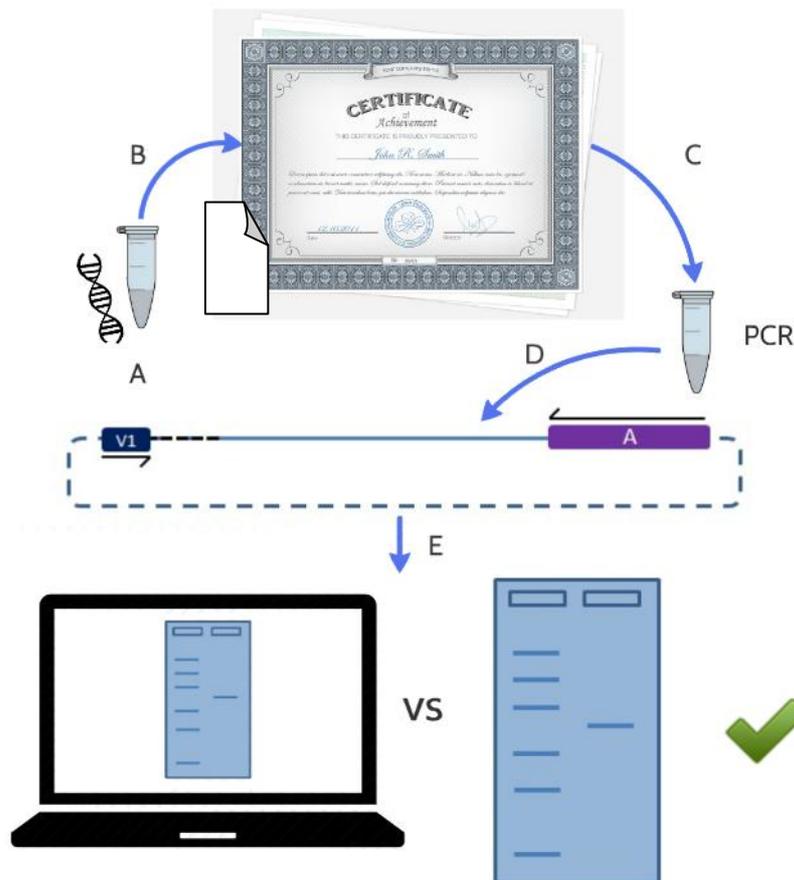


Figura 16. Esquema general del sistema. Diagrama general desde que se embebe la secuencia asignada hasta la posterior validación de las identificaciones mediante PCR. **Primera etapa:**(a) El ADN es embebido en la estampilla. (b) La estampilla es colocada en el título (**certificación**). **Segunda etapa:** (c) Ante la necesidad de validación, el título es enviado a la institución que lo emitió como centro calificado, en el laboratorio la estampilla es removida, y el ADN que contiene se eluye con agua. (d) Esta elución es sometida a PCR con el set de *primers* correspondientes. (e) Se realiza una comparación del gel con la información almacenada en la base de datos, la presencia de una banda del peso esperado indica la validez del documento (**validación**).

1° etapa: Asignación de ID

El algoritmo desarrollado permite asignar una secuencia de ADN identificadora (ID) a partir de ciertos datos contenidos en el documento tales como **nombre y apellido, DNI, cantidad de caracteres del nombre, dimensiones del diploma o color de la tinta (Figura 17 y 18)**. Las construcciones o IDs se seleccionan a partir de un conjunto de oligos prediseñados que se encuentran almacenados en una base de datos. En este caso, la base de datos de oligonucleótidos se encontraría en los UADE Labs de la Fundación UADE.

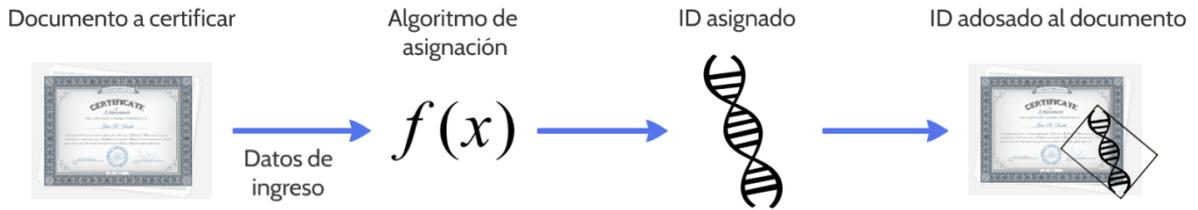


Figura 17. Flujo de trabajo. Los datos ingresados son procesados por el algoritmo de asignación. Se asignan los ID y son embebidos al documento.

Los IDs tienen la particularidad de haber sido diseñadas sin ningún tipo de significado biológico ni codificación de información personal. Las secuencias nucleotídicas solamente siguen lineamientos termodinámicos, que permiten el “revelado”, o amplificación, de las secuencias identificadoras de forma específica.

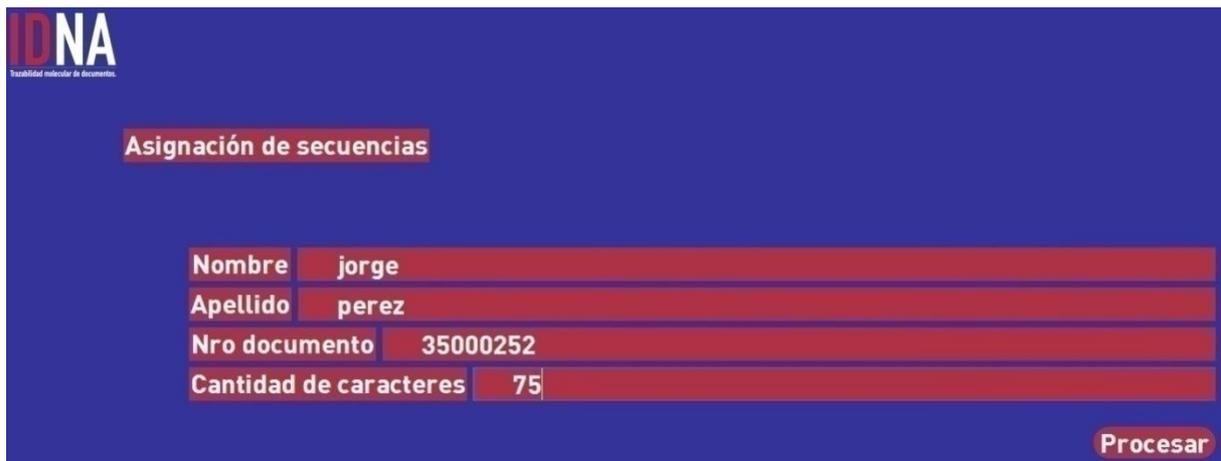


Figura 18: Ingreso de datos para la asignación. Pantalla de ingreso de datos: nombre, apellido, número de documento y cantidad de caracteres que son suministrados al algoritmo para realizar la asignación.

2° etapa: Cuestionamiento legal y validación

La segunda etapa comienza sólo si el documento es cuestionado (**Figura 19**). El titular del documento, o la institución que solicita la validación debe acercarse al lugar donde fue certificado el título para ser sometido a validación. Una vez ingresado al laboratorio se removerá la estampilla colocada en el reverso del título, se eluirá del soporte sólido el o los plásmidos que contienen el ID. Una vez que se encuentre en solución, se someterá a un proceso de amplificación por PCR utilizando el par de *primers* específicos a la

secuencia que contiene el documento. El paso siguiente consta de la verificación de la banda ID en un gel de agarosa.

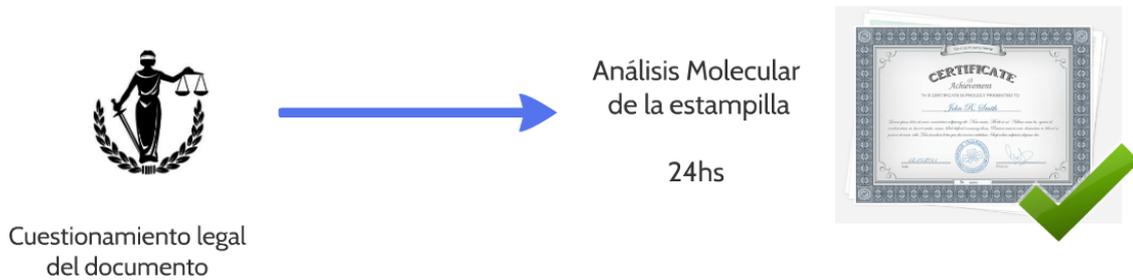


Figura 19. Cuestionamiento y validación del documento. El proceso de validación molecular dura aproximadamente 24 horas desde el momento de ingresado el documento al laboratorio.

La PCR genera productos de largos definidos. Estos productos, de tamaño específico y respuesta a *primers* puntuales, son los que sirven como identificadores de los documentos que cuentan con este sistema. Cada ID surge de un inserto diferente, clonado en un plásmido, y responde a *primers* específicos generando los productos de largo específico mencionados. Estos insertos son los que aportan la variedad de identificaciones posibles (**Figura 20**); un plásmido puede contener uno o más IDs, funcionando de forma análoga a lo explicado, devolviendo un patrón de identificaciones. A su vez se aumenta la variedad de patrones de identificación realizando combinatorias de IDs (Ver sección *Generación de IDs*).

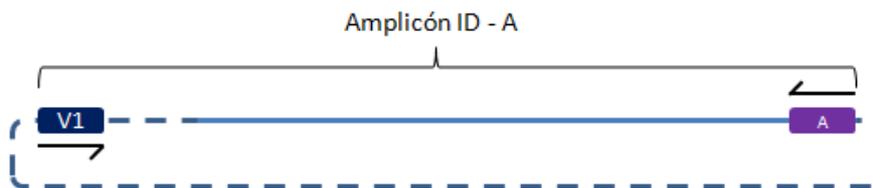


Figura 20. Diagrama de las construcciones que dan origen a los IDs. V1: Sitio de hibridación de primer forward. El amplicón producto de la amplificación con ambos *primer* “levanta” el ID deseado.

Si el documento analizado es auténtico la secuencia a validar amplificará con su par de *primers* específicos asentados en la base de datos (**Figura 21**). Se pueden obtener entonces dos tipos de resultados, dependiendo de cuál sea el caso.

- **Documento auténtico:** Presencia de una banda de ADN del tamaño esperado que indica la validez del documento.

- **Documento apócrifo:** Ausencia de la banda de ADN del tamaño esperado que indica la invalidez del documento (Nota: Este caso podría incluir la aparición de una banda de tamaño no esperado).

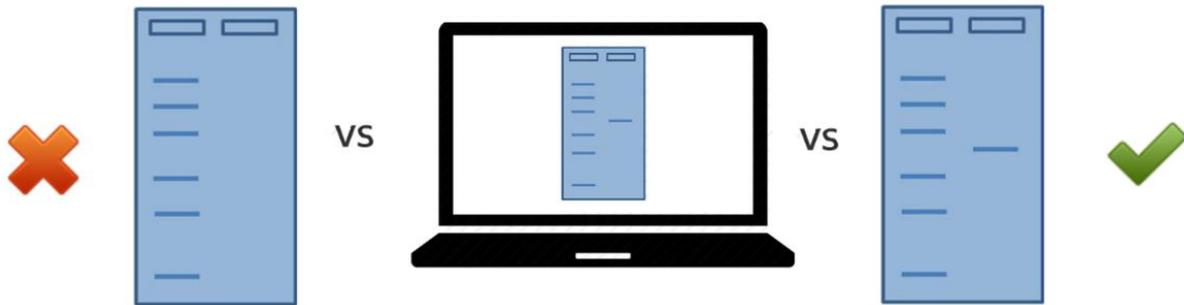


Figura 21: Resultados posibles luego del análisis de validación. Se compara el tamaño de la banda que aparece en el gel con el tamaño de banda ID correspondiente al título validado almacenado en la base de datos. La presencia de un amplicón de tamaño esperado indica la veracidad del documento, mientras que la ausencia del amplicón de tamaño esperado indica su invalidez. En el centro de la imagen se muestra el resultado esperado según la base de datos.

Intentos de vulnerar el sistema de IDs: casos particulares

Clonado de título

Para poder entrar en el circuito de validación la persona a validarse debe existir entre los usuarios que portan estos IDs. Podría existir el caso de que se emitiera un título clonado de alguien que existiera en la base de datos, por ejemplo obteniendo información sobre alumnos recibidos de la base pública del SICer, y se le añadieran IDs que fueron robados de otros títulos, siempre teniendo en cuenta que estas personas no saben cuál es el ID correcto para este usuario. Por lo tanto, en el caso de que pusieran múltiples IDs en una misma estampilla, y así aumentar las probabilidades de haber acertado el ID que le hubiera correspondido al usuario original, se puede aplicar un control durante la validación utilizando varios *primers* diferentes para generar un control negativo. En el caso de que amplifiquen otros IDs, que no sean los correspondientes, da la pauta de que el usuario no es válido (**Figura 22**).

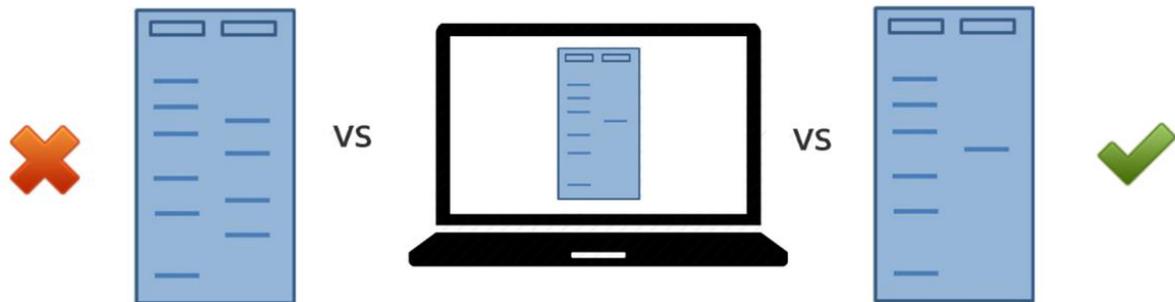


Figura 22: Clonado de título. En este caso la persona tiene un título clonado con muchos IDs para intentar acertar con el de la persona original. Esta situación podría evaluarse incorporando en la reacción de validación *primers* de otros IDs para generar controles negativos. En caso de que amplificaran se determinaría que se incorporaron IDs que no le fueron asignados al usuario invalidando el resultado.

Aplicación de ID en usuario no válido

La validación de un documento falsificado, fruto de la sustracción de una identificación, se ve imposibilitada con este sistema. En primer lugar, se necesitaría acceder a un título original, remover cuidadosamente el plásmido, y luego ser colocado en uno o varios títulos falsos. Esta secuencia al ser amplificada genera un ID, pero el usuario no podrá contrastarse contra un usuario válido en la base de datos, con lo cual ante este amplicón la validación resulta inválida (**Figura 23**).

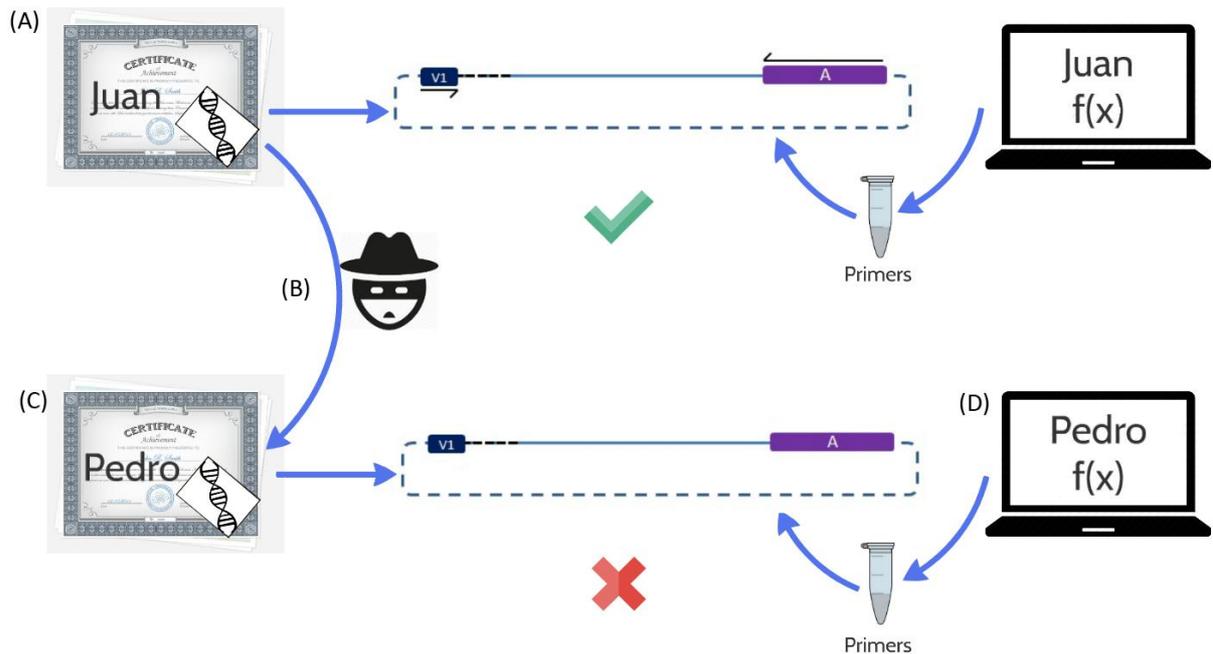


Figura 23: Robo de ID. (A) El diploma de Juan, posee una estampilla certificada con IDs de ADN válidos, al amplificar con los *primers* correspondientes al documento de Juan se obtendrá un amplicón de tamaño esperado. (B) El plásmido que contiene el ID de la estampilla certificada de Juan es sustraído. (C) El diploma “trucho” de Pedro ahora posee uno, o más, plásmidos robados. (D) Al momento de la validación, Pedro no se encuentra en la base de datos por lo que no se pueden seleccionar *primers* que amplifican un ID (el documento es automáticamente inválido).

De ser las validaciones una práctica rutinaria y extendida en la población, se disuadiría a los falsificadores de continuar con sus prácticas. Con el paso del tiempo además irá creciendo la base de IDs existentes con lo que el n de muestras necesarias a robar para falsificar efectivamente un documento sería cada vez mayor dificultando la tarea.

Algoritmo de asignación

¿Qué es un algoritmo?

Un algoritmo es un procedimiento bien definido de instrucciones para resolver un problema. Dicho procedimiento se nutre de datos de **entrada** y, mediante las instrucciones, genera uno o varios resultados. En otras palabras se comporta como una secuencia de instrucciones que transforma datos de entrada en datos de salida (**Figura 24**). Para diseñar un algoritmo se debe que tener total conocimiento del problema a resolver (variables, restricciones y posibles resultados) (Cormen *et al.* 2001).

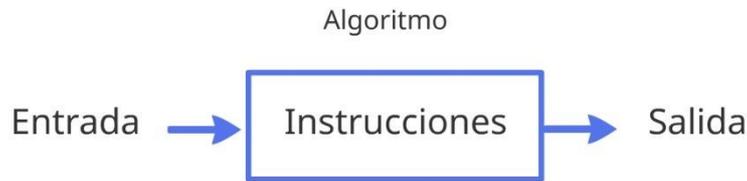


Figura 24. Esquema general de un algoritmo. Un algoritmo es un set de instrucciones al cual ingresan datos y salen resultados, pueden ser imágenes, respuestas, números, etc.

El **algoritmo** de asignación fue pensado en colaboración con Guido De Luca (Alumno de la Licenciatura en Bioinformática de la Fundación UADE). Guido fue el encargado de su desarrollarlo en el marco de una Actividad de Ciencia y Tecnología (ACyT) del Instituto de Tecnología de la UADE. Cumple con la función de asociar a un individuo con una secuencia preexistente, creando así un registro de identidad.

¿Cómo funciona el algoritmo de asignación?

Al registrar los datos de ingreso, nombre, apellido, número de documento o número de identificación único y/o cantidad de caracteres, los mismos son convertidos al código ASCII tomando su equivalente valor numérico. Una función cosenoidal mantiene los valores acotados entre -1 y 1. El módulo de toda la función permite que este resultado se mantenga siempre positivo y se lo multiplica por la cantidad de secuencias disponibles en la base de secuencias ID, de forma que nunca se obtengan más valores que la cantidad "n" de secuencias almacenadas en la base de datos (**Figura 25**).

$$\left| \text{REDONDEAR} \left(\frac{\sum_{i=1}^{\text{Long palabra}} (\text{ASCII}(\text{letra}[i]))}{\cos(\text{Factor} \cdot \pi / \text{Nro seq} + 1)} \right) \right| \cdot \text{Cant seq}$$

Figura 25. Ecuación de asignación. Ecuación que transforma los datos de ingreso en un valor de una posición que contiene almacenado un ID en particular.

Almacenamiento de IDs

Las secuencias ID se almacenan en una base de datos asignándoles una posición comprendida entre 1 y "n", siendo "n" la cantidad total de secuencias disponibles. La

magnitud de la base de datos le otorga al sistema la capacidad de volverse más robusto con cada secuencia extra agregada.

Debido a que los IDs disponibles existirán en una cantidad limitada no serán únicos por documento, sino que se repetirán. Para crear una mayor variedad de IDs, y reducir la frecuencia de repetición, se puede recurrir a emplear diferentes combinaciones de IDs por documento.

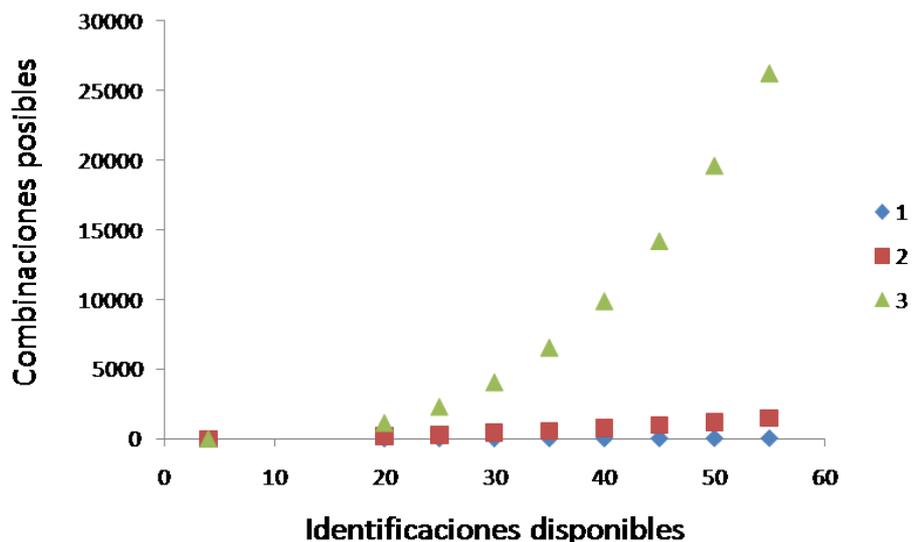
Utilizando cálculo de combinatoria se puede observar como aumenta la robustez del sistema a medida que se dispone de nuevos ID. Se realizaron simulaciones considerando 1, 2 y 3 IDs por estampa, disponiendo 4, 20, 25, 30, hasta 55 IDs. En el ejemplo “extremo” de considerar 3 IDs por estampa contando con 55 IDs disponibles la cantidad de IDs combinados ascendería a 26235 IDs contra los 55 que se tendrían utilizándolos de a uno (**Figura 26**).

$$\binom{m}{n} = \frac{[m]_n}{n!} = \frac{m(m-1)\cdots(m-n+1)}{n(n-1)\cdots 3\cdot 2\cdot 1} = \frac{m!}{n!(m-n)!}$$

(A)

n \ m	4	20	25	30	35	40	45	50	55
1	4	20	25	30	35	40	45	50	55
2	6	190	300	435	595	780	990	1225	1485
3	4	1140	2300	4060	6545	9880	14190	19600	26235

(B)



(C)

Figura 26. Combinatoria de IDs . Fórmula de combinatoria (A). Se calcula el número de combinaciones de m elementos tomados de n en n. **Combinatoria de IDs (B).** "m" equivale a la cantidad de IDs disponibles y "n" la cantidad de IDs combinados a la vez, pudiéndose observar las combinatorias posibles o IDs únicos. **Combinatoria de IDs (C).** Se pueden realizar combinaciones que otorguen un aumento considerable en la seguridad de los títulos. El gráfico muestra la cantidad de IDs combinados posibles dependiendo de la cantidad de oligos disponibles en función de los agrupamientos.

La combinatoria de IDs permite aumentar la robustez del sistema utilizando una gran cantidad de secuencias, cuanto mayor sea la cantidad de IDs utilizados de forma combinada, creando patrones de identificación, el rendimiento de los mismos será mucho mayor. De esta forma en el caso de que alguien buscara dilucidar el sistema de asignación

sería necesario que obtuviera una muestra muy grande de documentos, disminuyendo así las probabilidades de que llegue a un resultado fortuito.

No se puede establecer una relación entre la secuencia asignada y el documento o la persona. Los datos de ingreso no se convierten en una secuencia particular que porte información generada a partir de datos personales. Por lo tanto, desde el punto de vista de realizar ingeniería inversa no se lograría obtener información coherente, ya que la identificación no lleva encriptados datos personales.

Almacenamiento de secuencias asignadas

Una vez asignadas las secuencias a un documento en particular, se almacenan en la base de datos la secuencia que fue asignada como ID, la persona dueña del título y el par de *primers* correspondientes para su amplificación. En el momento de la validación se accede a las secuencias almacenadas en la base de datos utilizando nombre, apellido y documento de la persona deseada (**Figura 27**).

Nombre	jorge
Apellido	
Nro documento	
Resultados	
Perez, Jorge - 35000250	
Kit N°	1
Secuencia	TGGGCAGTGGCCGTTGTTACACGCCTACCCGATGCTGAATGACCCGGACTAAAGTGGCGAAAATTATGGCGTGTGACCCGTTATGCTCCAATTCCGTCAGTGGTTCATTGCAAGTAGTCGATTGCATTGTCAATCTCCGAGTGATTTAGCGTGACAGCCGACAGGGAACCCATAAAATGCGATCGTAGTCCATCCGATCGTACATAGAAATGAGGGTCCCATACGCCACGCACCTGTTCACTCGTCG
Primer (forward)	GCTGAATGACCCGGACTAAA
Primer (reverse)	TGGGGACCCTCATTTCATG

Figura 27: Base de datos de secuencias IDs y *primers*. Los pares de primer que amplifican el amplicón ID asignado al documento quedan almacenados en formato digital junto a la secuencia ID que será amplificada. Se accede a esta información introduciendo el número de documento y nombre de la persona a fin de seleccionar el set de *primers* para la validación.

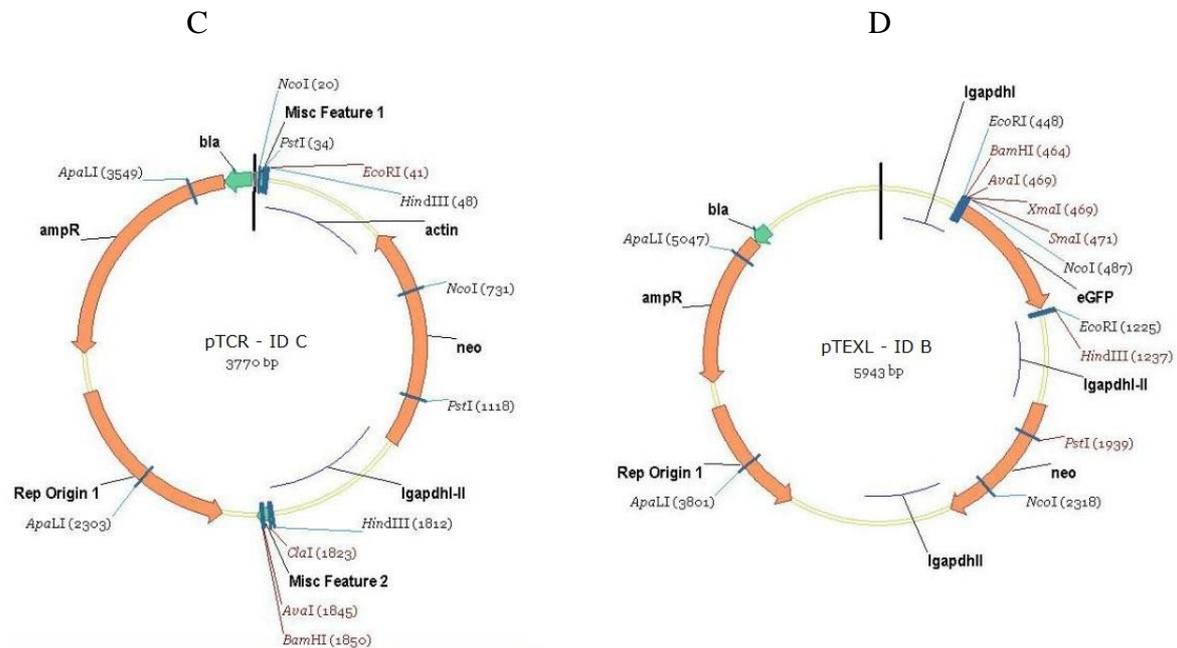


Figura 28: Mapa de plásmidos utilizados. (A) pUC19, (B) pDIY-mCherry, (C) pTCR-Neo-GA-minus (D) pTEXL-Neo. pUC19 fue utilizado para la etapa de intento de clonado. pDIY (ID A), pTEXL(ID B), y pTcR (ID C) utilizados como fuente alternativa de ADN.

A partir de cada plásmido es posible generar más de un ID con parejas de *primer* diferentes. Sin embargo, se puede obtener una cantidad limitada de *primers* de buena calidad, por lo que el tamaño del vector limita este aspecto.

Las secuencias que funcionan como identificación son “reveladas” mediante PCR utilizando un *primer forward* que hibrida siempre en una misma posición del vector, y varios *primer reverse* que pegan en diferentes regiones de los insertos que se encontraban clonados. Los sitios de hibridación de los *primers* definen el comienzo y el final del producto de identificación, la posición del primero define el inicio mientras que el sitio de pegado del segundo define el final y el largo de la secuencia. Al diseñar los *primers* uno de los parámetros a tener en cuenta fue que los amplicones resultantes no superaran los 1000 pares de bases para evitar tener problemas de resolución en los geles de agarosa.

Es posible generar múltiples ID a partir del mismo plásmido utilizando diferentes parejas de *primers* (Figura 29-A). Así como también se pueden utilizar varios vectores para la generación de una mayor cantidad de IDs (Figura 29-B). Siempre respetando que el *primer forward* hibride en una región fija del vector utilizado.

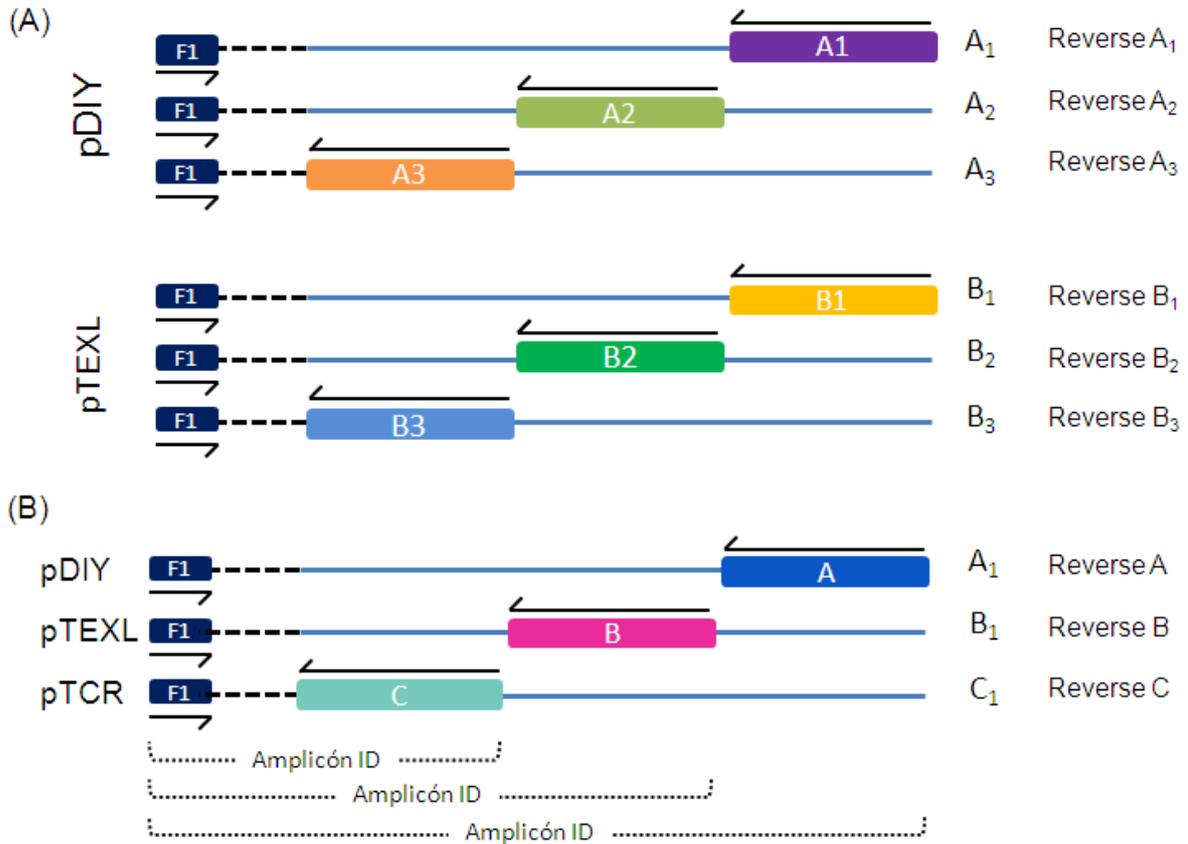


Figura 29. Estructura de los ID. (A) Cada set de ID responden a un mismo *primer forward* (PF), y a un *primer reverse* diferente para cada ID. (B) Pueden generarse identificaciones a partir de diferentes vectores con el mismo *primer forward* utilizando *primers reverse* diferentes.

En la **Tabla 1** se muestran los *primers* diseñados para la segunda estrategia. Asimismo, puede observarse el tamaño del amplicón resultante y el ID al que dan origen. Como se mencionó anteriormente, el plásmido pDIY-mCherry con su set de *primers* correspondiente, generan el ID – A y A₂ mientras que el plásmido pTEXL genera el ID B y el pTcR genera el ID C.

ID generado	Primer Forward	Primer Reverse	Amplicón
ID A	ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG	TGAACTCCTTAATGATTGCCACGT	243
ID A2	ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG	TTTGTCGACGTCGGATCCCG	206
ID B	ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG	TGCAATGAGAATTTGTTTGCTCT	933
ID C	ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG	CCTTGTAAGGTTTCTGAGATCGCG	496

Tabla 1. Listado de primers. Los *primers* listados se encuentran en dirección 5'-3'

Materiales y métodos

Equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto

Centrifuga refrigerada
Microcentrifuga
Espectrofotómetro (visible - uv)
Termocicladora
ThermoMixer
Vortex
Estufa (37° C)
Shaker (37° C)
Transiluminador UV
Freezer (-20° C)
Ultrafreezer (-80° C)

Material de vidrio y descartable

Tubos de 10 ml
Matraz Erlenmeyer (500 ml y 150 ml)
Ansas
Mecheros
Agua bidestilada y agua Roux (agua calidad soluciones parenterales)
Piseta con agua destilada
Micropipeta (p1000, p200, p10 y p2)
Guantes de látex (sin polvo)
Gradilla para tubos tipo eppendorf (1,5ml)
Lavandina
Descartes
Tips
Placas de petri

Preparación de medios de cultivo

Medio LB

- Triptona de caseína 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g
- Agua bidestilada c.s.p 1 L de agua.
- Se esterilizó mediante autoclave (121°C por 20 minutos a 1 atmósfera).
- Guardar en heladera o a temperatura ambiente

En el caso de necesitar medio sólido se agregó 15 g de agar por litro de medio LB previo a autoclavar.

Medio LB-Ampicilina

Previo a la utilización del medio se añade la ampicilina a una concentración final de 100 µg/µl. En el caso de estar utilizando medio LB-Agar se funde el medio, se deja enfriar y se adiciona el antibiótico antes de que agarice.

Medio SOB

- Triptona de caseína 20 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 0,5 g
- Disolver 0,186 g KCl en 950 ml de agua
- Ajustar el pH a 7 con una solución de NaOH 5N. Llevar a 1000ml
- Autoclavar a 121°C a 1 atmósfera por 20 minutos. Antes de utilizar se adicionan 5 ml de una solución MgCl₂ 2M estéril

Producción de stock de *E. Coli* Novablue

Se utilizaron bacterias *E. coli* Novablue k-12, de Novagen, las cuales son ideales para los pasos iniciales de clonado debido a su alta eficiencia de transformación. Estas fueron utilizadas para amplificar los plásmidos de trabajo y en los sucesivos intentos de clonado de la estrategia original. Dicha cepa posee mutados los genes *recA* y *endA*, arrojando como resultado un alto rendimiento de producto de ADN plasmídico de excelente calidad. La mutación en *recA* reduce la recombinación de ADN aumentando la estabilidad del ADN plasmídico, mientras que la mutación knock-out en *endA*, una endonucleasa no específica (endonucleasa I), mejora el rendimiento y calidad del plásmido ya que elimina su actividad.

Inicialmente se sembraron 50µl de cultivo de bacteria ON en una placa de petri con medio LB Agar, a partir de la cual se aislaron 3 colonias que se crecieron en 5ml de LB líquido overnight (ON). Tras 16 horas de crecimiento a 37° con agitación a 250 rpm, uno de los tubos fue seleccionado y con este se inoculó 1% del volumen de caldo contenido en un tubo con 5ml de medio LB.

Al día siguiente se inocularon 100 ml de medio LB con 1 ml de cultivo proveniente del cultivo de bacterias ON, y se creció hasta alcanzar el "punto humo", momento en el cual las bacterias del cultivo presentan un aspecto similar al humo al ser agitadas, el punto se alcanza 2 horas después de iniciado el cultivo.

Stock de bacterias en glicerol: Se utilizó en una proporción 75% cultivo bacteriano / 25% glicerol estéril para almacenar las bacterias competentes, y las bacterias transformadas con plásmidos a -80°C .

Bacterias competentes

- Inocular 1 ml de medio LB con *E. coli Novablue*. Crecer ON a 37°C .
- A la mañana siguiente sembrar 3 ml de LB con 0,1 ml del cultivo.
- Agitar a 37°C hasta llegar a "punto humo" (aprox. 2 horas).
- Centrifugar en centrífuga a 4°C 4000 rpm.
- Resuspender el pellet con 800 μl de CaCl_2 50 mM. Dejar a 4°C 15 min.
- Centrifugar 2 minutos a 4000 rpm a 4°C .
- Resuspender en 250 μl de solución CaCl_2 50 mM glicerol 15%.
- Guardar a -70°C o continuar con la transformación.

Se llevó a cabo siguiendo una adaptación del protocolo de competencia de la Guía de Biología Molecular 2009 del Departamento de Química Biológica de la Universidad de Buenos Aires.

Transformación bacteriana

Las bacterias fueron transformadas por el método de "shock térmico". Las bacterias competentes fueron incubadas con el ADN durante 15 minutos en hielo y sometidas a un golpe térmico a 42°C durante 90 segundos. Rápidamente fueron recuperadas con el agregado de 1 ml de medio SOB, incubando a 37°C por 15 minutos. Finalmente fueron centrifugadas a baja velocidad y sembradas en placas con LB-Ampicilina [$100\mu\text{g}/\mu\text{l}$]. Se seleccionaron 2 de las colonias que quedaron aisladas en la placa.

Se sembraron 4 placas: 1) LB-Ampicilina con las bacterias transformadas. 2) Control Negativo. LB-Ampicilina con bacterias sin transformar (se realizó la transformación con agua Roux). 3) Control de viabilidad. LB con dilución $10\text{E}-6$. 4) Control ambiental. LB-Ampicilina sin sembrar.

Para la selección del soporte se utilizó el gen de la proteína de fluorescencia verde, GFP por sus siglas en inglés (*Green Fluorescent Protein*). El gen utilizado, disponible en la universidad se encontraba clonado en un vector TOPO. Fue amplificado en bacterias Novablue competentes. Las bacterias se dejaron crecer ON a 37°C en presencia de Ampicilina.

Plásmidos utilizados

- TOPO-GFP Se utilizó para evaluar la recuperación de ADN a partir de los papeles de filtro Whatman
 - pUC19 (catálogo - New England Biolabs) Se utilizó inicialmente para clonar los insertos que dan lugar a los ID. Ver Anexo I
 - pDIY-mCherry (JN596091) Se utilizó para la estrategia alternativa de generación de los ID.
 - pTcR-GA-Neo-minus (JN566084) Se utilizó para la estrategia alternativa de generación de los ID.
 - pTEXL-Neo (JN596099) Se utilizó para la estrategia alternativa de generación de los ID.
- Los plásmidos fueron cedidos por la Dra. María de los Milagros Camara como una alternativa al clonado en pUC19 para la generación de las secuencias ID.

Técnicas analíticas de ácidos nucleicos

Extracción de ADN plasmídico - Miniprep

A partir de bacterias *E. coli Novablue* transformadas, utilizando un protocolo de lisis alcalina modificado (Birnboim y Doly, 1979), se realizó la extracción de los 4 plásmidos utilizados para el proyecto.

Solución P1: 25 mM Tris-HCl (pH8), 10mM EDTA (pH8), 50mM glucosa

Solución P2: 0,2N NaOH, 1%SDS

Solución P3: 3M acetato de potasio pH 4,8 o 3M acetato de sodio pH 5,2

- Incubar a 37°C 2 ml de LB-Ampicilina
- Centrifugar 5 ml de medio con bacterias a 4°C durante 30 segundos a velocidad máxima.
- Remover el sobrenadante.
- Agregar 200 µl de solución P1, vortexear e incubar 5 minutos en hielo.
- Agregar 300 µl de solución P2. Mezclar por inversión 5 veces con cuidado. Poner en hielo 5 minutos.
- Homogeneizar suavemente.
- Agregar 300 µl de solución de renaturalización P3. Mezclar por inversión. Incubar en hielo de 10 a 15 minutos.
- Centrifugar durante 15 minutos a 10000 rpm a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Agregar 1 µl de RNAasa (10 µg/µl)
- Agregar 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Centrifugar a máxima velocidad 15 minutos
- Recuperar la fase acuosa y trasvasar a un tubo limpio.
- Agregar 700 µl de isopropanol.

- Centrifugar 15 a 20 minutos a 10000 rpm a 4°C y descartar el sobrenadante.
- Agregar cuidadosamente 500 µl de etanol 70% por las paredes del tubo para lavar el pellet.
- Centrifugar 5 minutos a 10000 rpm.
- Remover el sobrenadante.
- Secar el pellet al aire durante 5-10 minutos.
- Resuspender el pellet en 20 µl de agua bidestilada.
- Almacenar el ADN plasmídico hasta su utilización a -20°C para conservar a largo plazo o 4°C para uso a corto plazo.

Extracción de ADN plasmídico – Midiprep

Se realizó utilizando el kit para midiprep de Qiagen (Cat. #12143 and #12145) con el fin de obtener una masa de plásmido en el orden de los mg, y tener suficiente material para la siembra y recuperación en los soportes a analizar. El protocolo seguido fue el incluido en el kit y el volumen final en el que se resuspendió el plásmido purificado fue de 300 µl en H₂O bidestilada estéril.

Precipitación de ADN plasmídico con etanol

- Medir el volumen de la muestra de ADN.
- Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio 0,3 M (concentración final) y mezclar.
- Agregar de 2 a 25 volúmenes de etanol 100% frío y mezclar.
- Mantener a -20°C durante 20 minutos o más (se realizó durante 30 minutos)
- Centrifugar a máxima velocidad 15 minutos.
- Retirar sobrenadante.
- Agregar 1 ml de etanol 70%. Mezclar. Centrifugar 15 minutos a máxima velocidad.
- Secar el pellet al aire.
- Resuspender el pellet en 20 µl de Roux.
- Disolver entre 50°C y 60°C por 5 minutos.

Recuperación de ADN de soportes en papel

Para recuperar el plásmido de ADN en filtros de papel:

- Para recuperar el plásmido, utilizar una hoja de bistrú limpia y cortar uno de los papeles que contiene el ADN.
- Sumergir el papel en 30 µl de buffer TE y pipetear la mezcla.
- Esperar 10 minutos y usar 2 µl para transformar bacterias competentes.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue utilizada para la amplificación de los diferentes IDs. Se realizó tanto PCR convencional (**Tabla 2-A**) como multiplex (**Tabla 2- B**).

(A)	Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad	(B)
	H ₂ O	20,50 µl	H ₂ O	20,25 µl	
	Buffer 10X	2,5 µl	Buffer 10X	2,5 µl	
	dNTPs 10mM	0,5 µl	dNTPs 10mM	0,5 µl	
	MgCl ₂ 50mM	0,75 µl	MgCl ₂ 50mM	0,75 µl	
	Primer Forward 10mM	0,25 µl	Primer Forward 10mM	0,25 µl	
	Primer Reverse 10mM	0,25 µl	Primer Reverse 10mM	0,25 µl	
	Taq Polimerasa 5U/µl	0,25 µl	Primer Reverse 2 10 mM	0,25	
	Volumen Final	25 µl	Taq Polimerasa 5U/µl	0,25 µl	
			Volumen Final	25 µl	

Tabla 2. Mezcla para PCR estándar y multiplex.

Se utilizó el programa estándar para PCR, se modificó la temperatura de *annealing* en función de la secuencia target a amplificar (Tabla 3).

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	94°C	3 minutos.
35 ciclos	94°C	45 segundos
	Variable según ID	45 segundos.
	72°C	45 segundos.
1 ciclo	72°C	10 minutos.
1 ciclo	4°C	Hold

Tabla 3. Programa de la termocicladora para las reacciones

Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Los geles de agarosa 1% se prepararon en solución TAE 1X con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Las muestras sembradas se resuspendieron con el volumen correspondiente de buffer de carga 6X. Los geles fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador.

Dependiendo del tamaño de los ID se necesitaron diferentes porcentaje de agarosa para la resolución **Tabla 4**.

% de agarosa recomendado	Resolución óptima para DNA linearizado
0.5	1,000–30,000bp
0.7	800–12,000bp
1.0	500–10,000bp
1.2	400–7,000bp
1.5	200–3,000bp
2.0	50–2,000bp

Tabla 4. Resolución de ADN lineal en geles de agarosa

Fuente:(What percentage agarose is needed to sufficiently resolve my DNA sample? 2014)

Amplificación/Cuantificación del ADN de trabajo - TOPO-GFP

Para evaluar y seleccionar el soporte más adecuado se utilizó un plásmido TOPO con el gen de la Proteína Verde Fluorescente (TOPO-GFP). Se transformaron bacterias *E. Coli* Novablue con este plásmido. Posteriormente se realizó un *screening* mediante colony PCR para confirmar que colonias portaban el plásmido, amplificando con *primers* específicos el gen de GFP, una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% confirmó la presencia del gen con una sola banda correspondiente a los 720 pb (**Figura 30**).

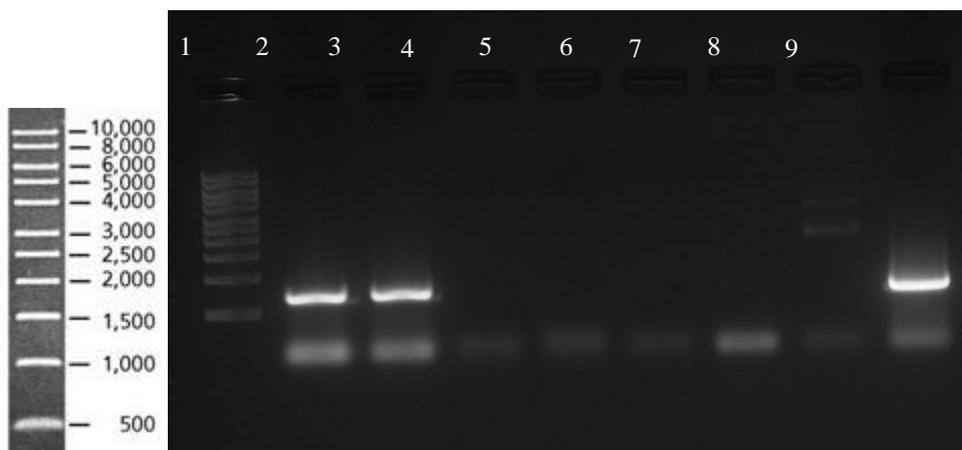


Figura 30. Resolución de bandas de GFP en gel de agarosa. Orden de siembra: Calle 1: 1 Kb Ladder Sigma. Calle 2: Novablue TOPO GFP Colonia 1. Calle 3: Novablue TOPO GFP Colonia 2. Calle 4: Novablue TOPO GFP Colonia 3. Calle 5: Novablue TOPO GFP Colonia 4. Calle 6: Control negativo: H₂O. Calle 7:

DH5 α con resistencia ampicilina. Calle 8: Control negativo con pUC19 vacío. Calle 9: Control positivo: TOPO GFP.

Todas las calles presentan residuos de primer al final de las calles por una elevada cantidad utilizada.

Los contenidos de las calles 4 y 5 no se tuvieron en consideración ya que los tubos se abrieron dentro la cicladora y su contenido se evaporó, no pudiéndose obtener un resultado. Producto de un defecto en la tapa de los tubos que se descubrió luego de terminada la reacción. No se realizaron pruebas nuevamente respecto a las muestras de estas calles ya que solo se necesitaba una colonia positiva para la amplificación.

La calle 7 corresponde a un tubo de bacterias disponible en la universidad el cual presento resistencia a ampicilina. Se ensayó posible presencia del gen de GFP.

Se amplificaron las colonias positivas creciéndolas en medio LB-Ampicilina para generar stock de bacterias con TOPO-GFP. Se realizó una midiprep, y linealizó el plásmido TOPO-GFP para cuantificarlo por electroforesis. Para la cuantificación se realizaron diluciones seriadas al medio, trabajando en un volumen final de 10 μ l. Se sembraron 10 μ l de las diluciones en un gel de agarosa al 1 % y luego de una corrida de 50 minutos a 100V, se procedió a la cuantificación del plásmido. Se deshicieron las diluciones, partiendo de la estimación de que la dilución 1/16 contenía 220 ng de ADN. Se calculó que la muestra sin diluir contenía 3530 ng de plásmido. Es decir 0,352 μ g/ μ l.

Resultados

El trabajo realizado en el laboratorio húmedo consta de tres etapas, la selección del mejor soporte disponible, la generación de los IDs (simples y combinados) y la validación del ADN adsorbido en las estampillas. En primer lugar se trataran los ensayos para la selección del soporte y una vez determinado cual es el más adecuado se procederá a explicar el trabajo realizado sobre los ID para la “certificación y validación” de las identificaciones.

El trabajo *in silico* respecto al algoritmo de asignación y su funcionamiento (resultado) fue presentado en la etapa de desarrollo debido a la estrecha relación entre la descripción y el funcionamiento.

Selección del soporte

El papel de filtro Whatman es el encargado de portar, adsorbido en él, el ADN que permitirá validar el documento como original. La elección del soporte fue un paso importante debido a que permite determinar con qué facilidad se recupera el ADN contenido en los soportes. A mayor cantidad de ADN recuperado más fácil será validar los documentos ya que se cuenta con una buena cantidad de muestra para realizar la amplificación.

Para la elección del soporte se tuvieron en cuenta 3 tipos de papel de filtro de celulosa de alta pureza marca Whatman que se encontraban disponibles en la universidad: papel de filtro etiqueta negra, este es un filtro que cuenta con una velocidad de flujo alta con poros de 12 μm a 25 μm ; filtro etiqueta blanca, con una velocidad de flujo media y tamaño de poro de 4 μm a 12 μm y filtro etiqueta azul de velocidad de flujo baja y poros de 2 μm (**Tabla 5**).

<i>Banda</i>	<i>Poro</i>
Banda negra	12-25 μm
Banda blanca	4-12 μm
Banda azul	2 μm

Tabla 5. Tamaño de poro según tipo de filtro. Fuente: (*Filtros de papel y membranas - Catálogo Whatman 2014*)

El ensayo de los papeles se realizó embebiendo el plásmido TOPO-GFP, que fue previamente amplificado en bacterias *E. Coli* Novablue y posteriormente purificado y cuantificado, en los 3 tipos de papel de filtro en cantidades equitativas. Se realizaron pruebas

empíricas embebiendo los filtros seleccionados con 0,5 µg y 1 µg de ADN. Antecedentes sobre el almacenaje de ADN plasmídico en papeles de filtro llevaron a realizar los ensayos en el orden del µg, consultas realizadas y protocolos compartidos en el sitio *Research Gate* indican que las siembras en papel de filtro han sido realizadas desde los 150 ng hasta los 2 µg de ADN.

Se realizaron pruebas con 0,5 µg y 1 µg. Posterior al sembrado se realizó la recuperación del ADN y en paralelo con el análisis de los papeles se sometió las recuperaciones a PCR dando resultados positivos con las recuperaciones de 0,5 µg y 1 µg de siembra. Dado que con una cantidad menor de ADN se obtuvieron resultados positivos se decidió trabajar con 0,5 µg de ADN (**Tabla 6**).

Los papeles de filtro con el ADN embebido se almacenaron en distintas condiciones de temperatura durante un periodo de 7 días: temperatura ambiente (24° C) en un lugar fresco y seco, a -20° C en freezer, y en estufa a 37° C.

<i>Tipo de filtro</i>	<i>Masa de plásmido</i>	<i>Volumen sembrado</i>
<i>Etiqueta negra</i>	<i>0,5 µg</i>	<i>1,42 µl</i>
<i>Etiqueta blanca</i>	<i>0,5 µg</i>	<i>1,42 µl</i>
<i>Etiqueta azul</i>	<i>0,5 µg</i>	<i>1,42 µl</i>

Tabla 6. Siembra de la muestra en papel soporte

Recuperación del ADN

Se realizó una modificación del protocolo de recuperación de *addgene (DNA on filter paper or tube 2016)*. Los papeles sembrados se colocaron en un tubo eppendorf de 1,5 ml con 70 µl de H₂O destilada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 30° C durante a 14000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente al paso de centrifugación se recuperaron aproximadamente 60 µl de los tubos.

Ensayos de eficiencia de recuperación

A partir del ADN recuperado de los papeles de filtro etiqueta negra, etiqueta blanca y etiqueta azul expuestos a diferentes temperaturas -20° C, temperatura ambiente (24° C) y 37° C, se transformaron bacterias *E. Coli Novablue* competentes con el fin de realizar una cuantificación relativa mediante recuento en placa. De esta forma, se pudo

realizar una comparación para determinar cuál era el papel que más ADN liberaba y por ende el más adecuado para su uso como soporte. Cada temperatura y papel ensayado se transformó por triplicado.

Luego de haber transformado las bacterias se resuspendieron en 50 µl de medio LB. Las diluciones del cultivo se sembraron en placas con medio sólido LB-Ampicilina y se crecieron ON a 37° C (**Figura 31**)

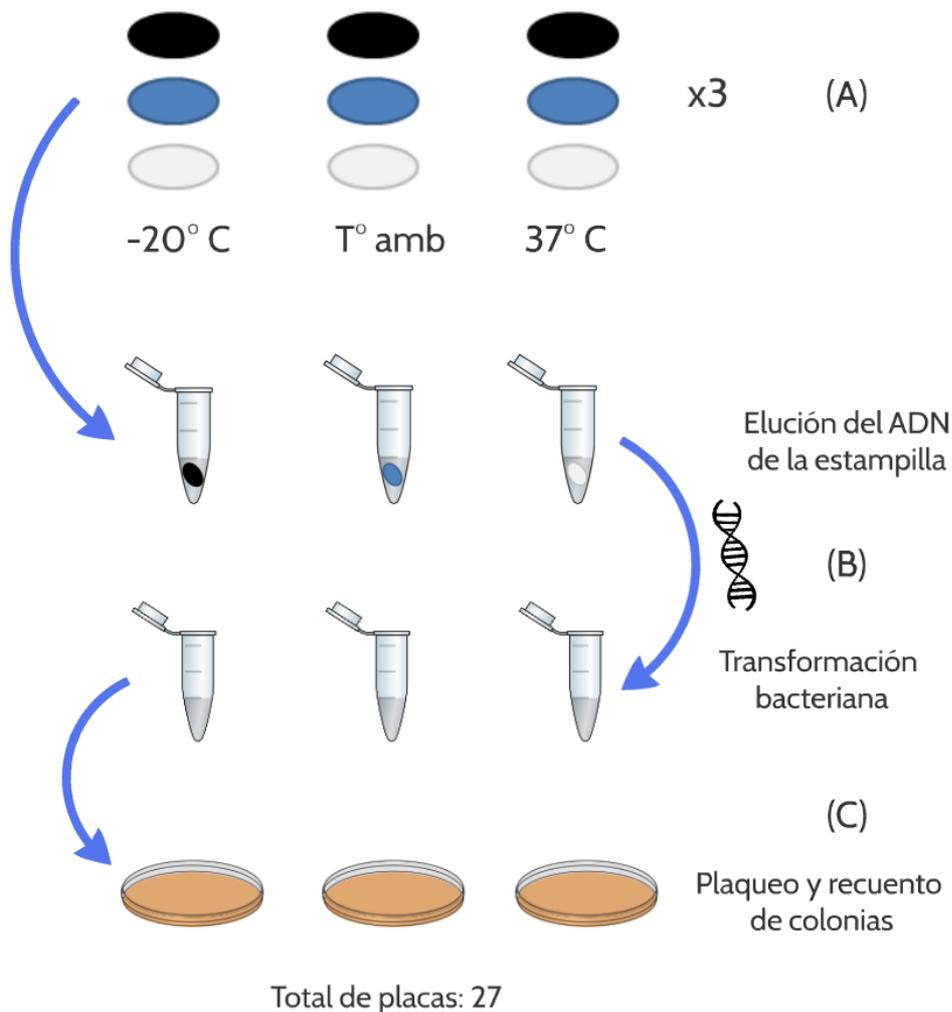


Figura 31: Diagrama de la evaluación de los papeles de filtro Whatman: Etiqueta negra, Etiqueta azul y Etiqueta blanca. (A) Los tres tipos de papeles embebidos con el ADN fueron expuestos durante una semana a -20° C, temperatura ambiente (24° C) y 37° C, esta experiencia se realizó por triplicado. (B) Se procedió a eluir el ADN de los papeles en agua destilada y con esta recuperación se realizaron transformaciones bacterianas. (C) Las bacterias transformadas se sembraron en placas de petri con LB-agar ampicilina. Dado que cada papel a cada temperatura se ensayó por triplicado el total de placas resultantes fueron 27, es decir 9 por cada tipo de papel. A mayor cantidad de colonias obtenidas mayor es la cantidad de ADN que se pudo recuperar de cada papel de filtro.

Como último paso se realizó un recuento en placa de las colonias crecidas (**Figura 32**). El ensayo se basó en la premisa de que aquellas placas que presentaran mayor cantidad de colonias crecidas corresponden a las bacterias transformadas con mayor cantidad de ADN y por ende con mayor cantidad de ADN liberado del soporte.

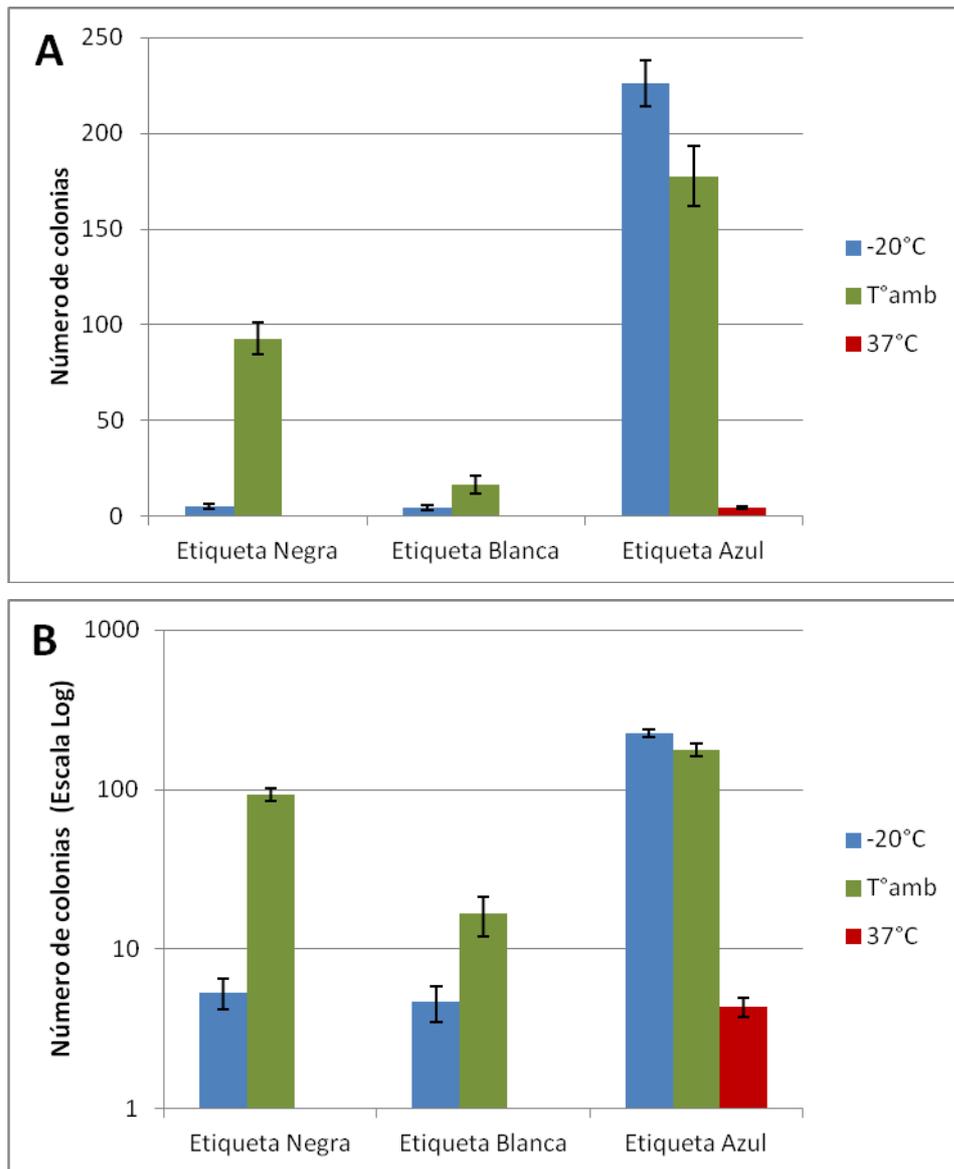


Figura 32: Cantidad de colonias obtenidas por recuento en placa tras la transformación con el ADN recuperado. Ambos gráficos muestran la cantidad de colonias obtenidas tras la recuperación del ADN de los soportes físicos, una mayor cantidad de colonias transformadas en la placa indican una mayor cantidad de ADN liberado. El **gráfico A** se encuentra en escala lineal mientras que en el **gráfico B** se aplicó logaritmo en base diez a la escala para una mejor visualización de los datos. La cantidad de colonias obtenidas con el ADN proveniente del papel de filtro de etiqueta azul es mayor que las obtenidas con los papeles de filtro etiqueta negra y etiqueta blanca, siendo este último el que peores resultados arrojó.

Para una mejor visualización de los datos se aplicó logaritmo en base diez a la escala (**Figura 32-B**). La mayor cantidad de colonias se obtuvo con el papel de banda azul (2 μm), razón por la cual se puede inferir que fue la que mayor cantidad de ADN liberó durante la recuperación.

A partir de los resultados obtenidos se observó que a **37° C** las colonias obtenidas de las transformaciones a partir de los papeles etiqueta negra y blanca fueron nulas, y para etiqueta azul fueron casi nulas con 4 colonias promedio.

A **temperatura ambiente (24° C)** comparando los papeles etiqueta azul y negra se obtuvieron un 191% más de unidades formadoras de colonias (ufc) a partir del papel etiqueta azul. Y al comparar el papel etiqueta azul con blanca la relación de ufc fue de 1065%.

A **-20° C** considerando los papeles etiqueta negra y blanca con respecto al papel etiqueta azul las relaciones fueron de 4264% y 4839% respectivamente.

En base a estas observaciones se concluye que el papel etiqueta azul, por ser el que permitió recuperar la mayor cantidad de ADN en todas las temperaturas evaluadas, es el mejor candidato a soporte. Una vez determinado qué papel entre los disponibles era el más apto a ser utilizado como soporte para llevar las secuencias ID, se procedió a seguir con la etapa de validación de las “estampillas” con ADN.

Generación de IDs por PCR

Los plásmidos utilizados para esta etapa de validación fueron, pDIY-mCherry, pTEXL-Neo y pTcR-GA-Neo-minus, los cuales fueron amplificados en bacterias. Los IDs contenidos por estos plásmidos, y los que permiten validar el documento, respectivamente son ID-A y ID-A₂, ID-B y ID-C. Los nombres de los IDs surgen de asignar a cada plásmido una letra y cambiar el subíndice de los IDs según la cantidad de IDs que se generaron a partir del mismo plásmido. Siendo A y A₂ productos que se obtienen del mismo plásmido.

El primer ensayo constó en testear los *primers* encargados, realizando PCR con los diferentes plásmidos, para poder así confirmar que se obtuvieran amplicones de los tamaños correspondientes de los diferentes IDs (**Tabla 7**)

Plásmidos	Bandas ID	Amplicones generados (pb)
pDIY-mCherry	A	243
pDIY-mCherry	A ₂	206

pTEXL	B	933
pTcR	C	496

Tabla 7. Tamaño de bandas esperados por ID.

Los IDs A, A₂, B y C mencionados en la **Tabla 7** fueron amplificados utilizando el *primer forward* cuyo sitio de pegado se encuentra en todos los plásmidos que se utilizaron en el proyecto (sitio V1), y los *primer reverse* cuyo sitio de pegado es diferente para cada ID (A, B o C) (**Figura 33**).

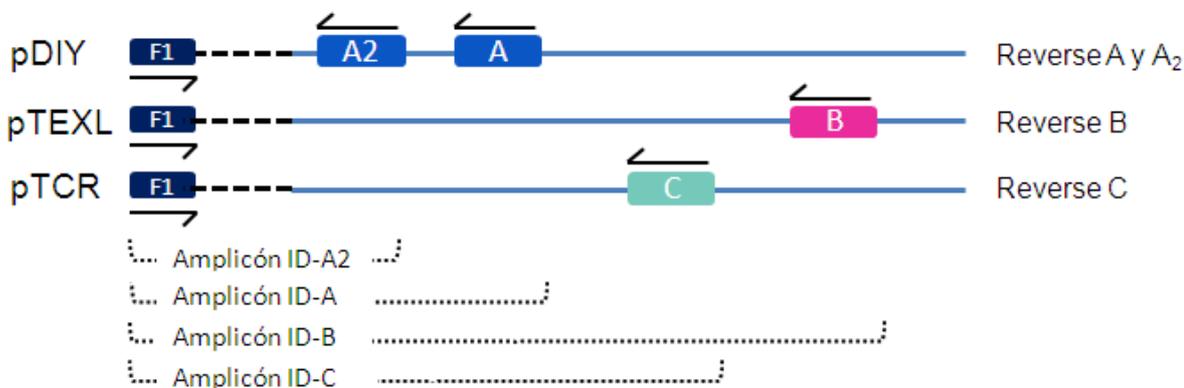


Figura 33: Amplificación de secuencias ID. La amplificación de las secuencias ID con los plásmidos pDIY-mCherry, pTEXL-Neo y pTcR-GA-Neo-minus utilizando *primers* específicos correspondientes (IDs A, A₂, B, y C). Los *primers reverse* y *forward* amplifican una región determinada revelando la secuencia identificadora verificando la autenticidad del documento.

Posterior a la PCR con los plásmidos mencionados y sus juegos de *primers* se sembraron en un gel de agarosa para su resolución. Se obtuvieron las bandas correspondientes a los ID A₂, A, B, y C (243 pb, 206 pb, 933 pb, y 496 pb) respectivamente (**Figura 34**). Estos amplicones serán los esperados durante el proceso de validación de los documentos.

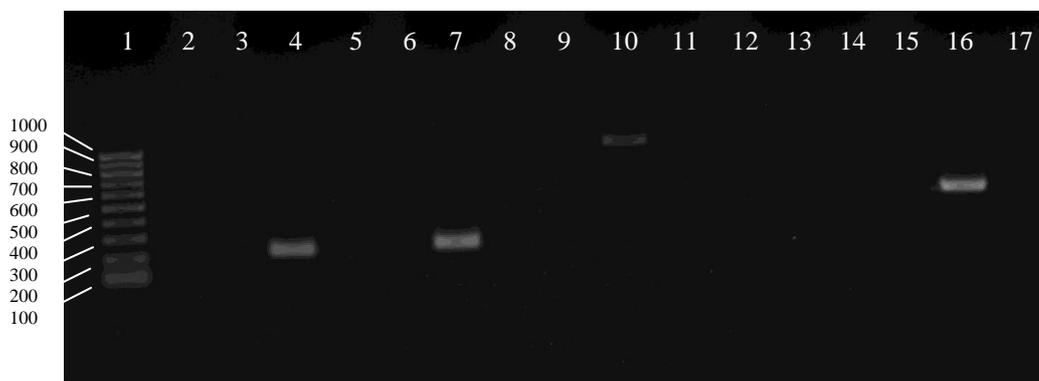


Figura 34: Separación por electroforesis de todos los amplicones ID. Se realizó una PCR de cada identificación por separado, para testear cada par de *primers* correspondiente en un gel de agarosa al 1%. Calle 1: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 4: ID A₂ (206 pb). Calle 5: control negativo. Calle 7: ID A (243 pb). Calle 8: Control negativo. Calle 10: ID B (933 pb). Calle 11: Control negativo. Calle 12: ID C₂. Calle 13: Control negativo. Calle 16: ID C (496 pb). Calle 17: Control negativo.

El ID C₂ se ensayó en reiteradas ocasiones obteniéndose en todas las oportunidades resultados negativos. Por lo tanto se excluyó del grupo de IDs.

Validación: Análisis molecular de la estampilla Revelado de IDs

Si bien la puesta a punto de la elusión del papel ya se había probado con éxito utilizando el plásmido TOPO-GFP, aún quedaba pendiente eluir los plásmidos originales del proyecto utilizando el papel de filtro seleccionado. A efecto de llevar a cabo el proceso de validación, recuperando el ADN a partir de la estampa en la que se encuentran adsorbidos los IDs, se realizó una siembra sobre el papel seleccionado como mejor soporte entre los disponibles (papel Whatman etiqueta azul). A continuación se eluyeron los plásmidos, se realizó la reacción de PCR con los *primers* correspondientes a cada ID y se corrió un gel de agarosa donde cada banda presente corresponde a una identificación positiva (**Figura 35**).

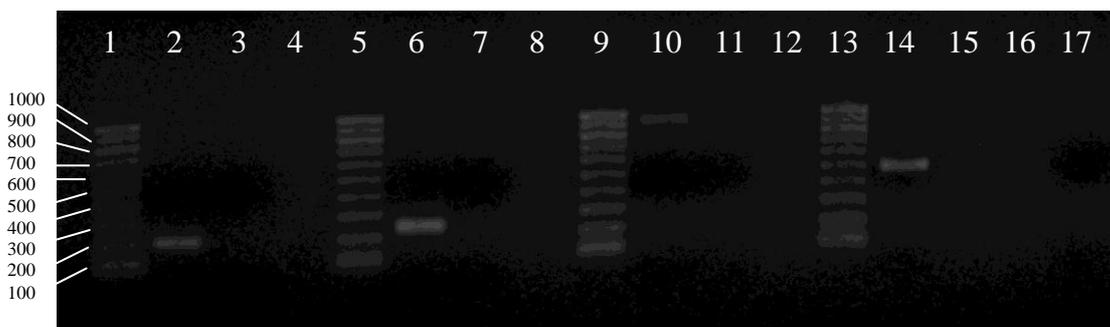


Figura 35: Electroforesis en gel de agarosa de los ID recuperados. Calle 1: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 2: ID A₂ (206 pb). Calle 3: Control negativo. Calle 5: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 6: ID A (242pb). Calle 7: Control negativo. Calle 9: PCR 100 bp Low Ladder Calle 10: ID B (933 pb). Calle 11: Control negativo. Calle 13: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 14: ID C (496pb). Calle 17: Control negativo. Gel de agarosa al 1%.

Combinaciones de IDs

Con el objetivo de generar mayor variedad de identificaciones, los IDs pueden disponerse en múltiples combinaciones, generando diferentes patrones de identificación. Esto es posible siempre y cuando se respeten las condiciones termodinámicas que permitan el

correcto funcionamiento de los diferentes *primers* que estarán en juego en la reacción, es decir que la diferencia entre sus temperaturas de *melting* sea menor a los 5 grados. El mejor escenario se dará cuanto más similares sean estas T° *melting*.

A fin de lograr esto se utilizaron pares de *primers* cuyas temperaturas de *annealing* óptima (T_{aOP}) fueran similares para realizar las PCR con varios *primer reverse* diferentes formando así dicho patrón de bandas. Los IDs A, A₂, y D comparten una T_{aOP} de 54° C y la temperatura óptima para el ID C es de 58° C.

Las temperaturas de *annealing* según el ID:

- ID A T_{aOP} : 54° C
- ID A₂ T_{aOP} : 54° C
- ID B T_{aOP} : 58° C
- ID C T_{aOP} : 54° C

En el caso particular de los IDA₂-A puesto que el tamaño de los amplicones resultantes difiere en solo 37 pb, para lograr una buena resolución de las bandas se utilizó un gel al 3% (**Figura 36**).

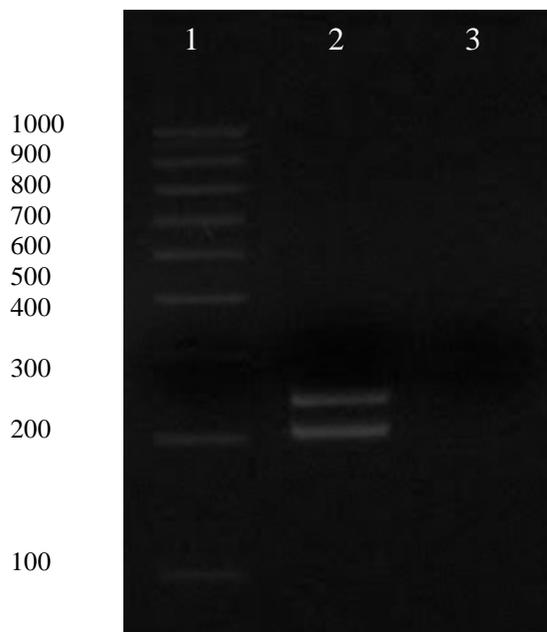


Figura 36: Resolución de los IDA₂-A en gel de agarosa. Calle 1: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 2: ID A₂-A (206 bp y 243 bp) correspondientes a la amplificación del plásmido pDIY-IDA (mCherry) con el *primer forward* y los *primers reverse* A y A₂. Calle 3: control negativo. Gel de agarosa al 3%. La banda de 300 pb del marker quedo oculta tras la mancha de buffer de carga 6X.

Luego de demostrar la correcta amplificación de los IDs A, A₂, B y C, se decidió mostrar diferentes escenarios de validación, utilizando IDs simples o combinación de IDs mediante amplificación multiplex de dos IDs para generar un patrón de identificación. La idea de este ensayo sería mostrar algunos casos donde se pueda observar cómo serían estas amplificaciones con múltiples IDs. Se realizó la validación de “patrones de ID” con los ID: B-A, B-A₂, C, y en la calle 14 se sembró un “ID inválido” producto de una PCR realizada sobre un “certificado inválido”, este consistió del ID B con los *primers reverse* A₂ a fines de mostrar cómo se vería una validación si la persona no posee la secuencia correcta en la estampilla (**Figura 37**).

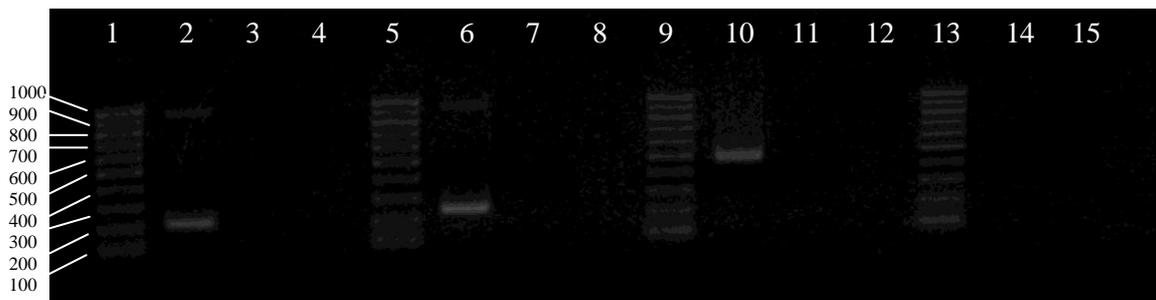


Figura 37: Electroforesis en gel de agarosa de patrones ID. Calle 1: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 2: ID B-A₂ (933 bp y 206 bp). Calle 3: Control negativo. Calle 5: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 6: ID B-A (933 bp y 243 bp). Calle 7: Control negativo. Calle 9: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 10: ID C (496pb). Calle 11: Control negativo. Calle 13: PCR 100 bp Low Ladder. Calle 14: ID C amplificado utilizando primer reverse A₂. Calle 15: Control negativo. Gel de agarosa 1%.

Las calles 2 y 6 presentan las bandas de los ID B-A₂, y B-A respectivamente, la banda de 933 pb de C está presente pero su brillo es muy tenue, posiblemente debido a la diferencia de TaOP entre ellos.

La **Figura 38** muestra otra combinación de bandas para formar un patrón de IDs, las bandas amplificadas son las correspondientes a los ID A₂ y B de 206 bp y 496 bp respectivamente.

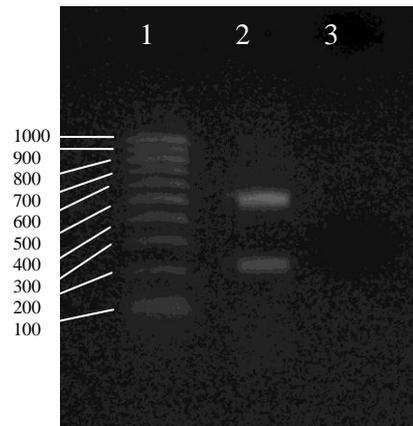


Figura 38: Resolución de los IDA₂-C en gel de agarosa. Calle 1: 100 bp PCR ladder. Calle 2: ID A₂-C (206 bp y 496 bp). Calle 3: control negativo. Gel de agarosa al 1%.

Cada amplicón obtenido indica que el “certificado validado” por medio de esta PCR es válido, ya que se obtuvo el amplicón de tamaño correspondiente por haber utilizado los *primers* correctos. Mientras que en el caso hipotético ensayado para un “documento inválido” (**Figura 37 – calle 14**) no se obtuvo un amplicón por tener un plásmido diferente al correspondiente, los *primers* utilizados eran los correctos pero el documento inválido contenía otra secuencia (**Figura 39**).

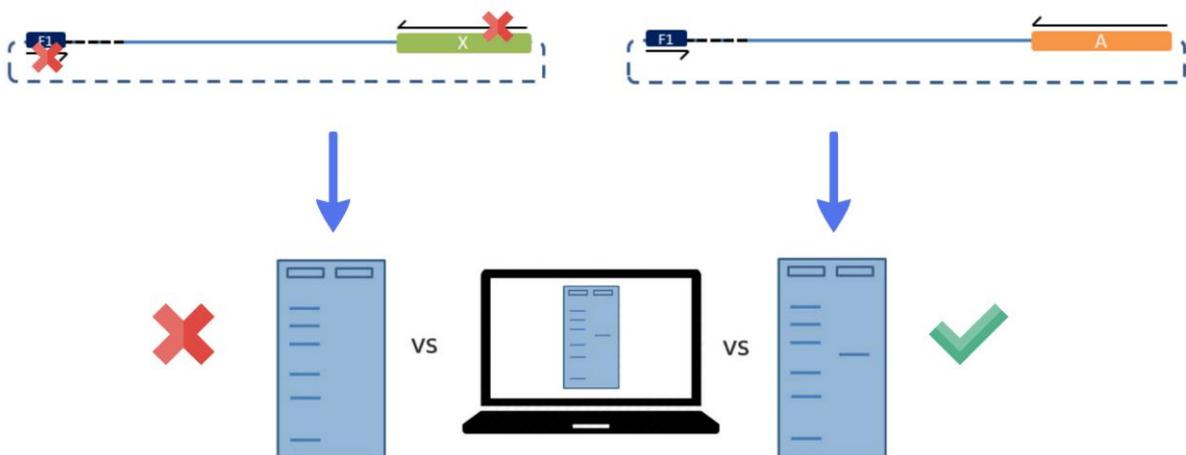


Figura 39: Caso válido e inválido. Todos aquellos IDs que sean los correspondientes al usuario y que por lo tanto amplifiquen con los *primers* que les corresponda serán válidos. En el caso de tener un documento no válido que cuente cualquier secuencia de ADN, o en su defecto ninguna, serán inválidos, no tendrán producto de amplificación.

Habiendo ensayado los diferentes escenarios posibles de IDs simples y combinados, así como la falta de amplificación de estos con los *primers* incorrectos se completa la puesta a punto y validación de la estrategia desarrollada para este proyecto.

Discusión y conclusiones

Generalidades

La idea de utilizar macromoléculas biológicas, como el ADN, para la identificación y validación de documentos surge ante la problemática de su falsificación. A pesar de los muchos y diferentes sistemas de seguridad existentes, la falsificación de certificados en el ámbito académico es una problemática delictiva creciente en la cual enfocamos nuestro trabajo. Por lo antedicho, amerita importancia continuar aumentando la complejidad en la normalización documental. Dando lugar a que sistemas de seguridad futuros sean cada vez más complejos en la búsqueda continua de protecciones efectivas para proteger los documentos.

En los últimos tiempos, se han puesto al descubierto grupos delictivos responsables de la falsificación y venta de títulos educativos, desde certificados analíticos de nivel secundario hasta títulos universitarios. Esta alerta llevó al Ministerio de Educación de nuestro país a la creación e implementación de sistemas más elaborados de seguridad llegando, en enero del 2012, al desarrollo del SICer. Dicho sistema recurre a la aplicación de códigos de barras y remitos electrónicos asociados para la validación de títulos y certificados analíticos.

La propuesta presentada buscó desarrollar una alternativa en materia de seguridad de documentos haciendo uso del ADN. Su uso como molécula validadora demostró, respecto de otros sistemas existentes, que presenta mayores niveles de seguridad por ser invisible al ojo humano desnudo y tener la capacidad de ser utilizado como portador de una secuencia identificadora. La secuencia identificadora de ADN puede ser camuflada entre otras secuencias de ADN presentes imposibilitando o complicando su distinción. Esto adicionado al sistema vigente llevaría a muy bajas probabilidades de falsificación ya que supone una barrera tecnológica compleja que no está al sencillo alcance de los mal intencionados grupos delictivos.

Durante el desarrollo de nuestro proyecto y su redacción se hizo un seguimiento de las ofertas vía web de títulos falsificados y, a pesar de las medidas tomadas en los últimos años, la falsificación de títulos educativos no ha cesado. Basta con mirar ciertos perfiles de *Facebook* donde, con total impunidad, continúan realizando ventas de títulos.

Nuestra investigación del estado del arte mostró que existen empresas que se encargan de ofrecer servicios de seguridad basados en ADN como ser *Selecta DNA* y *Applied DNA* con alcance operativo en el extranjero lo cual representa una ventaja para desarrollar

nuestro sistema a nivel nacional. Por otro lado si bien hemos encontrado información sobre el desarrollo de tintas con ADN que permiten su impresión en un documento (Nissha, 2011) o que pueden imprimirse en la superficie de objetos (Hayashida *et al*; 2004), hasta donde llega nuestra investigación, nuestro trabajo es el único que busca crear un sistema de certificación y validación de títulos universitarios.

Nuestro sistema consta de IDs de ADN contenidos en estampillas que se adosan a documentos las cuales a simple vista se asemejan a sistemas actualmente utilizados pero que portan un poderoso cifrado invisible como sistema de seguridad. En la práctica propuesta los títulos contarían con una estampilla sumada a las que llevan implementadas, como ser el código de barras del SICer, pero con un nivel de seguridad mucho mayor.

Cabe destacar que el desarrollo del presente proyecto se encuentra dentro del marco de una universidad por lo que enfoque fue orientado directamente a la certificación y validación de los títulos que la Fundación UADE podría emitir en un futuro. Si bien los plásmidos y constructos desarrollados en este trabajo no serán utilizados en el prototipo final, nuestra visión, a través de esta tesis, es poder contribuir a mitigar la práctica delictiva que afecta a las altas casas de estudio. Sin duda, la estrategia de trazabilidad molecular proporciona un valor agregado, en materia de seguridad, a los documentos emitidos por cualquier institución educativa.

Elección de soportes

La elección del soporte fue un paso muy importante debido a que sus propiedades determinan con qué facilidad se recupera el ADN contenido en él. Para la elección del soporte se tuvieron en cuenta 3 tipos de papel de filtro de celulosa de alta pureza marca Whatman: Filtro etiqueta negra, el cual cuenta con una velocidad de flujo alta con poros de 12-25 μm ; Filtro etiqueta blanca de velocidad de flujo media y tamaño de poro de 4-12 μm y filtro etiqueta azul de velocidad de flujo baja y poros de 2 μm .

Se realizaron ensayos para evaluar que papel de filtro permitía recuperar una mayor cantidad de ADN, y como se comportaban a distintas temperaturas conservando las muestras embebidas en los 3 tipos de papel de filtro a -20°C , temperatura ambiente (24°C) y 37°C , durante una semana. Los resultados más favorables se dieron a bajas temperaturas (-20°C) mientras que se obtuvieron resultados significativamente desfavorables cuando se expusieron a temperaturas elevadas (37°C). Estos ensayos concuerdan con los esperados según

Manabu Murakami (Murakami, 2013) quien plantea que el factor más importante a tener en cuenta para la estabilidad del ADN a largo plazo es la temperatura. Según un informe de la empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*) (IDT, 2014) establece que el ADN, tanto sea deshidratado o resuspendido en agua o buffer TE, a 37° C es estable hasta 6 semanas, mientras que a temperatura ambiente en agua son más inestables que en papel de filtro, pudiendo durar hasta 60 semanas. Nuestro ensayo se realizó durante una semana, tiempo que no debería ser suficiente para degradar completamente el ADN a 37° C, por lo tanto se desconoce si la ausencia de colonias, como método para la cuantificación del ADN recuperado, se puede atribuir completamente a la temperatura o a que el plásmido quede retenido en el papel de filtro. Esta incertidumbre se basa en el caso de la precipitación de ácidos nucleicos donde si el pellet de ADN se seca demasiado se vuelve muy difícil de resuspender. Si este fuese nuestro caso, sería difícil de obtener una buena recuperación del ADN ya que se encontraría atrapado por las fibras del soporte.

Independiente mente del soporte utilizado otro de los parámetros a ser tenidos en cuenta son la temperatura y la humedad. En ambientes no controlados las variaciones podrían ser amplias, sólo considerar nuestro país se evidencian rangos desde bajo cero hasta 45° C dependiendo de la latitud y estación del año que sea.

Por último, otro factor a considerar que influye en la estabilidad de los plásmidos que contienen los IDs es la humedad ambiente, el hecho de que el ADN se encuentre deshidratado le impide ser hidrolizado, o exponerse a contaminantes enzimáticos que adquieren su función catalítica al encontrarse en un medio acuoso. En la próxima sección, *perspectivas a futuro*, se plantea una serie de propuestas para evitar que los IDs se vean afectados por la influencia de estos factores.

[El algoritmo de asignación e IDs de ADN como sistema de certificación y validación.](#)

El desarrollo del algoritmo de asignación permite la creación de un vínculo entre los documentos y las secuencias. Dicha fórmula es una de las piedras angulares del sistema pues de esta manera las bandas identificadoras se encuentran vinculadas al propietario por medio de información intrínseca del certificado. Sin embargo, la identificación que portaría el documento no expone información personal del propietario ni del documento en sí. Como se ha mencionado anteriormente estas identificaciones son prediseñadas y no llevan ningún tipo de información codificada. Estas secuencias se convierten en identificaciones al

ser asignadas mediante el algoritmo en función de datos de ingreso. Un sistema que codificara información personal o sensible en los IDs sería posible considerarlo una amenaza ante la posible sustracción de información privada de sus usuarios mediante ingeniería inversa del sistema.

La robustez de nuestro sistema yace en la cantidad de secuencias que se encuentren disponibles para asignar. La combinatoria de IDs permite, como fue tratado anteriormente, aumentar la seguridad o complejidad del sistema. Cuanto mayor sea la cantidad de IDs disponibles, al utilizarlos de forma combinada creando patrones de identificación, el rendimiento de los mismos será mucho mayor, es decir existirá una frecuencia menor de repetición de cada ID. De esta forma en caso de que alguien buscara dilucidar el sistema de asignación sería necesario que obtuviera una muestra muy grande de documentos, disminuyendo así las probabilidades de que llegue a un resultado fortuito.

Desde el punto de vista del algoritmo, si este fuera vulnerado siempre se puede cambiar hacia una nueva función de asignación. Resumiendo, con este sistema no se permite obtener información personal de los usuarios a partir base a los IDs, y además contando con un n grande de IDs se disminuyen las probabilidades de que un título falso tenga un ID "correcto". Esto sumado al hecho de que el ADN es invisible y requiere "llaves moleculares" para su revelado aportan al sistema gran robustez.

Inconvenientes con la estrategia original

Sistema de Clonados

Inicialmente el proyecto contaba con el diseño de secuencias identificadoras sin significado, es decir carentes de sentido biológico. Una serie de inconvenientes llevaron a que no se pudieran ser puestas en práctica, debido a que no se obtuvieron clonados exitosos dentro del tiempo estipulado para la tesis.

Entre los diversos eventos que pudieron haber ocurrido se puede considerar que haya habido algún error de síntesis o de entrega de producto por parte de la empresa que se encargó de sintetizar los oligos. Nos permitimos tener esta sospecha debido a problemas similares surgidos en otro proyecto donde este mismo proveedor entregó en dos oportunidades oligos que no eran los correspondientes.

Otra posible causa de los errores o ausencias de clonaje podría estar relacionado con el tipo de transformación que se llevó a cabo para modificar genéticamente

las bacterias con los productos de nuestra ligación. Los métodos de competencia actualmente empleados son la transformación química y la electroporación, la cual tiene un rendimiento 10 veces mayor (Roychoudhury *et al.*, 2009). Al haber realizado transformación química se obtiene una menor cantidad de bacterias transformadas, disminuyendo las probabilidades de que nosotros pudiéramos encontrar el clon que portara nuestro plásmido ligado al inserto correcto. Se podrían aumentar las probabilidades de encontrar el producto de ligación recurriendo a utilizar bacterias electrocompetentes.

Otra forma de agilizar el *screening* sería contando con x-gal y poder realizar un screening azul/blanco diferenciando a simple vista que colonias han incorporado algún tipo de inserto. Esto sería factible de llevarse a cabo ya que la cepa de trabajo utilizada, *E. Coli* Novablue, posee el gen de la beta-galactosidasa que es el protagonista de esta técnica.

Perspectivas a futuro

Diseño de la estampilla

Al momento de la selección de los soportes a analizar se decidió utilizar el papel de filtro Whatman, no solo por su disponibilidad en la universidad sino porque su alternativa, los Flinders Technology Associates (FTA) Cards que permiten estabilizar las muestras y lisar células, posteriormente al proceso de recuperación del ADN requieren de un lavado por poseer sustancias que interfieren en las aplicaciones *downstream*. El almacenaje a largo plazo de los IDs de ADN en papeles de filtro whatman requeriría de la adición de un estabilizante que mejore la vida media del ADN deshidratado. Existe actualmente en el mercado un producto llamado DNASTable (DNASTable - A DNA Preservation Product | Biomatrix 2016) que es compatible con aplicaciones *downstream* sin necesidad de lavados, como la PCR que es fundamental para el proyecto y que permite el almacenaje del ADN a temperatura ambiente (24° C) a largo plazo hasta 30 años. El mismo, se adiciona como estabilizante a la muestra y se lo deja secar, lo interesante de su uso es que permite que el secado se realice en los soportes elegidos, Ivanoba *et al.* evaluó la utilización de este estabilizante en muestras para *barcoding* con resultados favorables a temperatura ambiente y 56° C.

Este producto fue evaluado, además, por Howlett *et al.* realizando comparaciones entre muestras con y sin este estabilizante, conservándolas a diferentes temperaturas durante un año. Entre los resultados obtenidos observaron que la recuperación de ADN a partir del control a -20° C y la muestra conservada con el estabilizante a

temperatura ambiente eran muy similares. Estos resultados sugieren que la efectividad de este producto es comparable a la de un freezer de -20°C .

Además, en base a la bibliografía encontrada podríamos decir que resulta necesario el uso de una estampilla que permita aislar el ADN de los factores climáticos como la humedad presente en el medio ambiente, y de la exposición a la luz UV que daña el ADN. Según Hashiyada et al se sugiere el uso de ZnO como protección contra luz UV.

Un posible diseño del envase, que proteja a la muestra de la humedad y la luz, podría consistir en un sachet plano de aluminio (envase de muestra de perfume), que contenga en su interior el soporte que porta el ID, para ser pegado en el documento.

Generación de los ID por medio de software

Las secuencias ID generadas para este proyecto se realizaron con fines académicos a baja escala por lo que han sido diseñadas de forma manual, siguiendo los lineamientos termodinámicos dispuestos para la creación de un *primer*. Esto resultó en un trabajo laborioso que consumió varios meses del proyecto. Se llevaron a cabo varias pruebas termodinámicas entre los diferentes candidatos diseñados para evitar hibridaciones de *primers* cruzadas con sitios de otros IDs y homo/heterodímeros de *primers*.

La llegada de los bioinformáticos a la escena del mundo científico ha contribuido a agilizar y mejorar, mediante la creación de algoritmos, los análisis y procesamientos de información genética. Es por ello que sería de gran utilidad para agilizar la creación de los IDs contar con el diseño de un software por parte de los alumnos de Bioinformática, que sea capaz de diseñar secuencias de ADN de largos variables que cumplan los puntos expuestos en este trabajo. No sólo los tiempos y los errores se verían reducidos sino que aumentaría la cantidad de IDs posibles para certificar los títulos. Ya que de cuantas más secuencias se disponga para generar una combinatoria de identificaciones, más robusto será el sistema.

Aumentar la seguridad enmascarando los ID

Para aumentar la robustez del sistema a futuro sería útil utilizar ADN “señuelo”, que enmascare los ID con secuencias de ADN ajenas a la identificación o el plásmido que la contiene. De esta forma, ante la posibilidad de una sustracción y secuenciación de la fuente de ID de la estampa, imposibilitar al sustractor que sepa dónde se encuentra el ID.

Conclusiones

Conclusiones:

- Se logró diseñar un sistema de validación de títulos a pequeña escala.
- Se logró diseñar un algoritmo que permite asignar secuencias identificadoras a un documento en base a datos intrínsecos.
- Se probó la capacidad de utilizar moléculas de ADN como una forma robusta de identificación. El sistema diseñado es viable, rápido y sencillo. Aunque requiere una profundización en su desarrollo y optimización en futuros proyectos.
- Se determinó que el mejor soporte, entre los disponibles, para embeber ADN es el papel Whatman etiqueta azul.

Los resultados de los ensayos realizados durante el desarrollo del **sistema de trazabilidad molecular con ADN** muestran que es factible el uso y recuperación de ADN como un código de identificación aunque se encuentre en una temprana etapa de desarrollo

ANEXOS

En este anexo se expone el trabajo de clonado realizado sobre el vector pUC19 y el inserto comprado a la empresa GenBiotech que no se logró concretar.

El diseño original de generación de ID constó de un proceso de clonado de un inserto de 88 pb en un vector comercial pUC19, en el que el ID se genera al amplificar mediante un primer forward en una posición fija del vector y un primer reverse en una región del/los insertos. Esto permite como ya fue explicado generar varios ID con uno o varios insertos.

Digestión con enzimas de restricción

Para la confirmación del plásmido pUC19 se llevó a cabo una digestión enzimática con BamHI, una enzima de restricción que corta en un solo sitio del plásmido (**Tabla 2**). La digestión se realizó a 37° C en el *thermomixer* con agitación a 300 rpm durante 3 horas. Para digerir 1 µg de pUC19 se recomienda utilizar 1U de enzima, sin embargo se utilizaron 2U de enzima para digerir 0,3 µg de ADN durante un mínimo de 3 horas ya que se había observado que quedaba plásmido sin digerir con menos unidades y menos tiempo.

Tabla 2: Mezcla de digestión.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
BamHI (10U/µl)	0,2 µl (2U)
Buffer 10x (REact® 3)	1,5 µl
pUC19 (0,3 µg)	5 µl
H₂O	8,3 µl
Vf	15 µl

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión para buscar y confirmar la banda perteneciente a pUC19 (**Figura 40**).

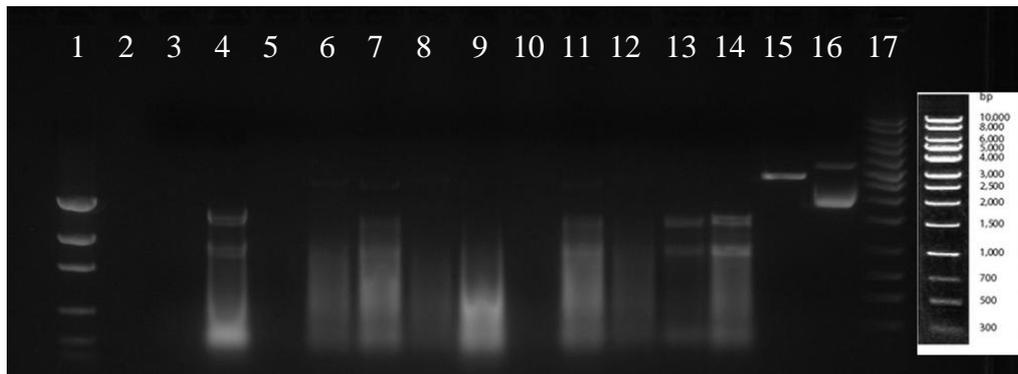


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa 1% de pUC19. El orden de siembra del gel corresponde a. Calle 1: Low mass ladder Invitrogen. Calle 3 Miniprep 10 µl. Calle 4 20 µl. Calle 5: Digestión simple con BamHI. Calle 6: Digestión simple con BamHI. Calle 7 Digestión simple con BamHI. Calle 8: Digestión simple con BamHI. Calle 9: Digestión simple con PstI. Calle 10: Digestión simple con PstI. Calle 11: Digestión simple con PstI. Calle 12: Digestión simple con PstI. Calle 13: Miniprep 10 µl. Calle 14: Miniprep 20 µl. Calle 15: Control positivo: pUC19 digestión simple con BamHI. Calle 16: Control positivo pUC19 sin digerir. Calle 17- 1 kb ladder.

Observaciones:

- Se presentan las bandas correspondientes al plásmido pUC19 en las calles 6, 7, 8, 9, 11, 12 y 14. A pesar de ser muy tenue la banda, fue la corrida en la cual se dispuso del material para realizar un control positivo. Así mismo las calles presentan contaminación por ARN en las miniprep caseras ya que no se encontraba disponible ARNasa en el laboratorio para trabajar. Las condiciones de corrida fueron 100 V durante 30 minutos en buffer TAE 1X
- En las calles 4, y 13 se puede ver las bandas que corresponden al ribosomal, 23S y 16S, pero no se llegan a ver bandas correspondientes a las demás conformaciones del plásmido, se puede suponer que la conformación *supercoiled* se encuentra superpuesta con la primer banda de ARN ribosomal o que el rendimiento de esas minipreps fue bajo, existiendo la presencia de plásmido pero en tan poca cantidad que no llega a verse en el gel.

Se realizó un segundo gel bajo las mismas condiciones de corrida donde se pudieron observar las distintas conformaciones del plásmido. No se dispuso de material extra para realizar un control positivo, ya que se trataba de material de clase prestado y era escaso, por lo que se comparó con correspondiente al gel anterior.

Doble digestión del vector pUC19 para clonado

Por otro lado se llevó a cabo una doble digestión con BamHI y PstI (**Tabla 3**) para la liberación del sitio deseado para el clonado de los insertos, obtenido por miniprep casera, mediante digestión con enzimas de corte único dentro del MCS. Para disminuir las posibilidades de tener material no digerido se realizó la doble digestión en dos etapas añadiendo enzima fresca cada 3 horas. Siendo el tiempo total de digestión de 6 horas.

Tabla 3: mezcla de digestión para clonado de inserto en pUC19

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
BamHI	1 µl (10U/µl) c/3 horas
PstI	0,5 µl (20U/µl) c/3 horas
Buffer 10x (REact® 3)	4 µl
pUC19	5 µl (1 µg)
H₂O	29,5 µl
Vf	40 µl

Desfosforilación de extremos 5'

El plásmido, pUC19, involucrado en los procesos de clonado fue defosforilado tras la digestión con 1 µl de CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) la cual se incubó durante 10 minutos a 37 °C.

Inactivación de enzimas

La inactivación de las enzimas de restricción y de la CIAP se realizó posterior a la precipitación etanólica, por lo cual se limitó solamente a inactivar a 80°C durante 20 minutos, de acuerdo a los protocolos de las enzimas de restricción.

Preparación del inserto

El inserto fue sintetizado por la empresa GenBiotech (Argentina). Ambas hebras del oligo se resuspendieron en agua Roux a una concentración final 200 µM. Una vez que se resuspendieron ambas hebras se procedió a realizar el *annealing* de ambas con el fin de obtener la secuencia doble hebra buscada. Se utilizaron las concentraciones de oligos

recomendadas en el protocolo para *annealing* de Invitrogen *Generating the Double-Stranded Oligo* (Tabla 4).

Tabla 4: Mezcla para el annealing de oligos

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>
Hebra superior (200µM)	5 µl
Hebra inferior (200µM)	5 µl
Buffer Annealing 10X*	2 µl
Agua libre de DNAsa/RNAsa	8 µl
Volumen Final	20 µl

*Buffer de Annealing 10X: 100 mM TrisHCl; 10 mM EDTA; 1M NaCl

El programa de la cicladora empleado para hibridar las hebras del inserto fue el *Protocolo de Annealing Alternativo* recomendado por Sigma-Aldrich:

- Calentar a 95° C y permanecer a 95° C por 2 minutos
- Rampa de enfriamiento hasta llegar a 25° C en un periodo de 45 minutos
- Realizar un spin breve de los tubos para bajar la humedad condensada en la tapa

Los productos de *annealing* fueron almacenados a 4° C hasta el momento de su uso.

Ligación

Una vez obtenidos los insertos y el plásmido purificado pUC19 doble digerido se realizó la ligación de ambos **Tabla 5**.

Tabla 5: Mezcla de ligación para el clonado.

<i>Reactivo</i>	<i>Ligación</i>	<i>Control de religación</i>
pUC190 (120 ng /20 µl)	8,33µl (50 ng)	8,33 µl
Inserto (22,18 ng/µl)	0,32µl(7,07 ng)	-
Buffer 10 X	2 µl	2 µl
Ligasa	1 µl (1U)	1 µl
H ₂ O	8,35 µl	8,67 µl
Vf	20 µl	20 µl

La cantidad de inserto y de plásmido doble digerido a utilizarse se determino estableciendo una relación 5 a 1 inserto: vector. Se utilizaron 7,07 ng de inserto.

ANEXO II – Diagrama de flujo del algoritmo de asignación

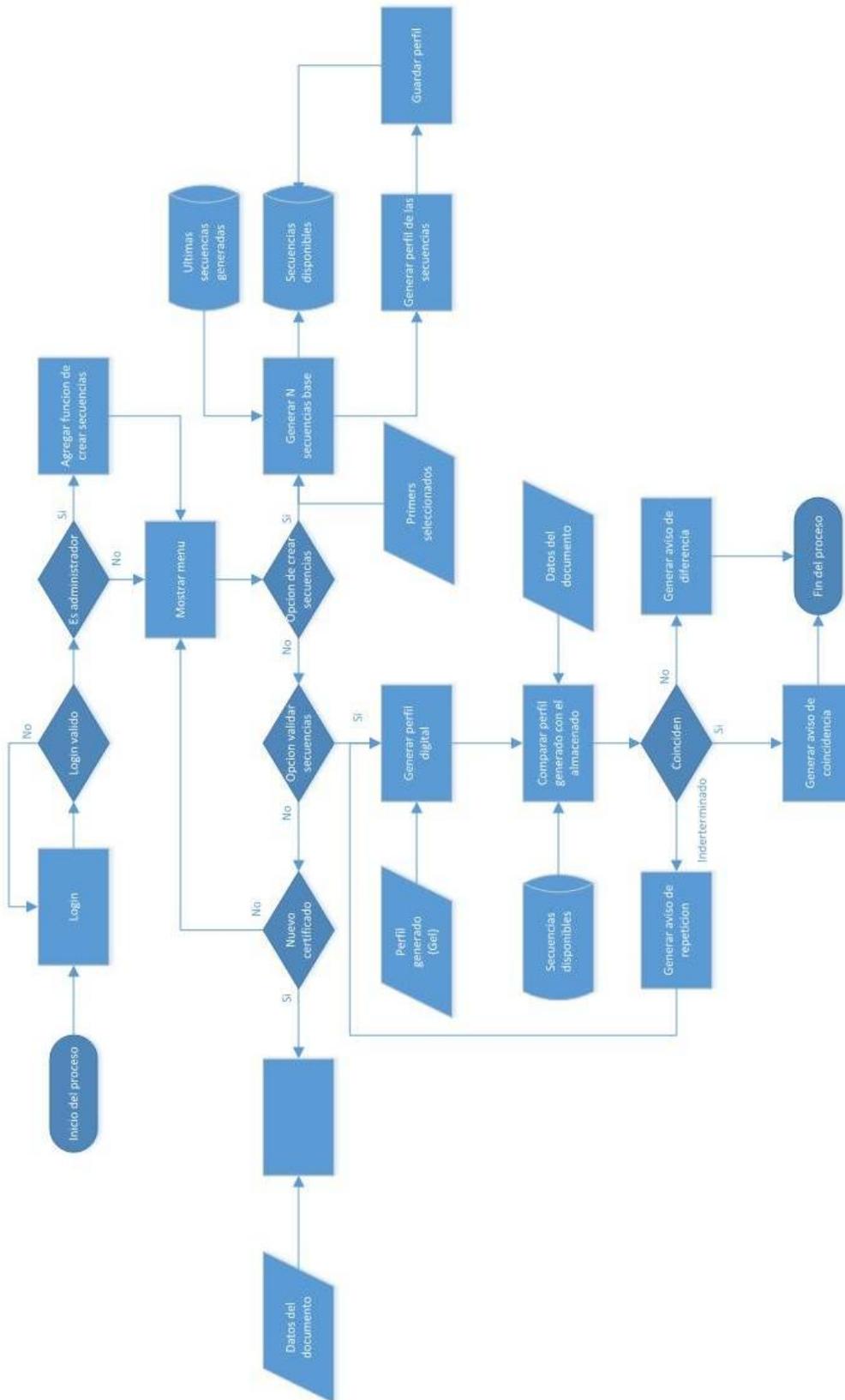


Figura 41. Diagrama de flujo de acción de toda la aplicación de validación de documentos mediante ADN. Partiendo desde la autenticación de la aplicación, flujo de pasos para el alta de un nuevo set de datos de validación hasta llegar al detalle de cómo es el flujo de validación de las secuencias dadas hasta las secuencias obtenidas.

ANEXO III –Recuento en placa del proceso de determinación de soporte

Recuento en placa de colonias provenientes de bacterias transformadas con la recuperación de GFP.

Papel Banda Negra con 0,5 µg de ADN sembrados		
Transformación c/recuperación - Frio (-20º)		
Colonias	Colonias	Colonias
6	6	4
Transformación c/recuperación - Tº Ambiente		
Colonias	Colonias	Colonias
102	86	90
Transformación c/recuperación - Calor 37º		
Colonias	Colonias	Colonias
0	0	0

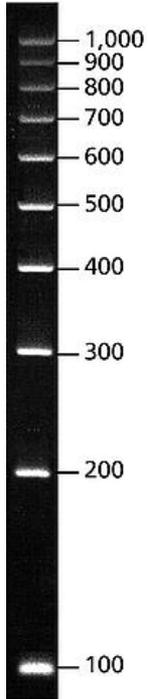
Papel Banda blanca con 0,5 µg de ADN sembrados		
Transformación c/recuperación - Frio (-20º)		
Colonias	Colonias	Colonias
4	4	6
Transformación c/recuperación - Tº Ambiente		
Colonias	Colonias	Colonias
22	13	15
Transformación c/recuperación - Calor 37º		
Colonias	Colonias	Colonias

0	0	0
---	---	---

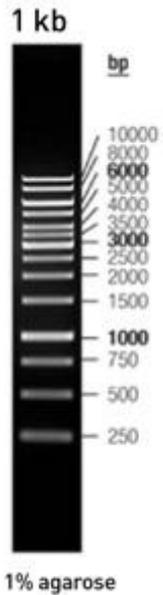
Papel Banda Azul con 0,5 µg de ADN sembrados		
Transformación c/recuperación - Frio (-20º)		
Colonias	Colonias	Colonias
239	216	223
Transformación c/recuperación - Tº Ambiente		
Colonias	Colonias	Colonias
194	163	176
Transformación c/recuperación - Calor 37º		
Colonias	Colonias	Colonias
4	5	4

Anexo IV – Marcadores

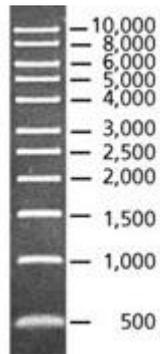
PCR 100bp Low Ladder de Sigma



1kb Ladder – Invitrogen



1kb Ladder – Sigma



Referencias y citas bibliográficas

- AHSAN, KAMRAN; SHAH, HANIFA; KINGSTON, PAUL. 2010. *RFID Applications: An Introductory and Exploratory Study*. *IJCSI International Journal of Computer Science Issues*, Vol. 7, Issue 1, No. 3. Enero 2010. ISSN (Online): 1694-0784. ISSN (Print): 1694-0814.
- AHSAN, KAMRAN 2011. *RFID Components, Applications and System Integration with Healthcare Perspective, Deploying RFID - Challenges, Solutions, and Open Issues*. Dr. Cristina Turcu (Ed.). ISBN: 978-953-307-380-4
- ALBERTS, BRUCE; JOHNSON, ALEXANDER; LEWIS JULIAN. 2004. *Molecular biology of the cell*. Capítulo 4: ADN y cromosomas. p. 194. Figura 4-3. Ediciones Omega. S.A. ISBN: 84-282-1351-8.
- Anexo de ley LEY DE EDUCACIÓN NACIONAL N° 26.206 Resolución CFE N° 59/08 Consejo Federal de Educación - Ministerio de Educación - Presidencia de la Nación. Sistema Federal de Títulos y Certificados Analíticos con Resguardo Documental. 2008.
- ASHBAUGH, DAVID. 1999. *Quantitative-Qualitative Friction Ridge Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Ridgeology*. p. 21. CRC Press. ISBN: 978-1-4200-4881-0.
- Barcodeoflife.org. *What Is DNA Barcoding?* « Barcode of Life. [online] Disponible en: <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding> [Consultada 8 Apr. 2016].
- BARNEKOW, ANGELIKA (2008). *DNA watermarks: a proof of concept*.
- BIRNBOIN & DOLY. 1979. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*.
- Biometrics History. *biometrics.gov* [online], biometrics.gov/documents/biohistory.pdf [Consulta 13 de Julio de 2014].
- BLOCK *et al* (2004). *DNA barcodes and watermarks*. The MITRE Corporation. McLean, Virginia.
- BOUVIER *et al*. 2013. *Plasmid Vectors and Molecular Building Blocks for the Development of Genetic Manipulation Tools for Trypanosoma cruzi*.

- Clarín, 2011, Detienen a un joven acusado de vender títulos universitarios truchos por internet. [online]. 2011. Disponible en: http://www.clarin.com/sociedad/venta_de_titulos_universitarios_truchos-joven_detenido_0_541146097.html
- CORMEN, THOMAS; LEISERSON, CHARLES; RIVEST, RONALD. 2001. *Introduction to algorithms, second edition*. Capítulo 1: *The Role of Algorithm in Computing*. pp. 3-5. MIT Press. ISBN: 0-262-03293-7.
- Departamento de QUÍMICA BIOLÓGICA - Guía de trabajos prácticos y problemas. www.qb.fcen.uba.ar [online], [Consulta Abril 28, 2015].
- DNA on filter paper or tube, 2016. Addgene Frequently Asked Questions [online]
- DNASTable - A DNA Preservation Product | Biomatrix, 2016. Biomatrix.com [online]
- EL "ABC" DE LA BANDA MAGNETICA, 2016. Tec-mex.com.mx [online],
- Filtros de papel y membranas - Catálogo Whatman, 2014. laboaragon.com [online]
- FINKENZELLER, KLAUS. 2003. *RFID Handbook: Fundamentals and Applications in Contactless Smart Cards and Identification*. John Wiley & Sons. Ltd. ISBN: 0- 470- 84402-7, p. 31.
- HAYASHIDA, MASAKI (2004). *Development of biometric DNA ink for authentication security*. Tohoku University Medical Press.
- HEBERT *et al.* 2003b. *Protocols for high volume DNA barcode*. Draft submission to: DNA working group, Consortium of barcode of life.
- HOWLETT *et al.* 2013. *Evaluation of DNASTable for DNA storage at ambient temperature*.
- IDT. 2014. Oligonucleotide Stability Study.
- IVANOBA, NATALIA; MASHA, KUZMINA. 2013. *Protocols for dry DNA storage and shipment at room temperature*. DOI: 10.1111/1755-0998.12134.
- JAIN, L.C. *et al.* (Eds.). 1999. *Intelligent Biometric Techniques in Fingerprint and Face Recognition*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- JAIN, ANIL; FLYNN, PATRICK y ROSS, ARUN. 2008. *Handbook of Biometrics*. Ed. Springer Michigan, USA. Capítulo 1 *Introduction to Biometric*. p. 18. ISBN: 978-0-387-71040-2
- JAIN, ANIL y KUMAR, AJAY. 2010. *Second generation biometrics: the ethical, legal and social context*. Ed. Springer Michigan, USA. Capítulo 3 *Biometric recognition: An overview*. pp. 49-79. MI 48824-1226.
- JAMES, S. y NORDBY, J. 2005. *Forensic science*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, pp.344-345.
- LEWIN, B. 2000. *Genes VII*. Oxford: Oxford University Press, Capítulo 1: *Genes are DNA*. pp.6-8. ISBN: 0-19-879277-8.
- MULLER, MAX. 2005. *Fundamentos de administración de inventarios*. Bogotá: Norma, pp. 97-102. ISBN: 958-04-8457-0.
- MURAKAMI, Manabu. 2013. *Evaluation of DNA Plasmid Storage Conditions*.
- NICOLOSO *et al.* 2013. *Recent Advance in DNA-based Traceability and Authentication of Livestock Meat PDO and PGI Products*.
- Nissha.com. 2011. Nissha Printing Co., Ltd. | Nissha Develops New Printing System with Plant DNA Ink. [online]. Disponible en: <http://www.nissha.com/english/news/2011/06/news-577.html> [Consultada 8 Apr. 2016].
- Portales.educacion.gov.ar. 2012. Nuevo procedimiento para la legalización de diplomas universitarios. [online]. Disponible en: <http://portales.educacion.gov.ar/spu/noticias/nuevo-procedimiento-para-la-legalizacion-de-diplomas-universitarios/> [Consultada 8 Apr. 2016].
- Reconocimiento de Caracter Óptico (OCR), 2016. Microscan.com [online],
- ROYCHOUGHURY, Aryadeep *et al.* 2009. *Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of E. coli using two common plasmid vectors*.
- SACCONI *et al.* 1999. *Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system*.

Visible Proofs: Forensic Views of the Body: Galleries: Biographies: Alphonse Bertillon (1853–1914), 2016. Nlm.nih.gov [online],

Visible Proofs: Forensic Views of the Body: Galleries: Biographies: Juan Vucetich (1858–1925), 2016. Nlm.nih.gov [online],

WALLACE, D.C., BROWN, M. D. *et al.* 1999. *Mitochondrial DNA variation in Human Evolution and Disease*. *Gene* 238:211-230.

WATSON, JAMES. 1968. *The double helix*. Kingsport Press Inc. Kingsport, Tennessee, USA.

What percentage agarose is needed to sufficiently resolve my DNA sample?, 2016. promega.com [online]

WILDES, R. P. Sep 1997. "Iris recognition: an emerging biometric technology," in Proceedings of the IEEE, vol. 85, no. 9, pp. 1348-1363. DOI: 10.1109/5.628669.

YUDELL, MICHAEL; DESALLE, ROBERT. *The genomic revolution: Unveiling the unity of life. Part III Using maternal and paternal genes to unlock human history*. pp. 131-146. Joseph Henry press. Washington, DC 20418. ISBN:0-309-07436-3.