



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1  
2ej

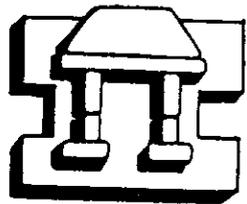
CAMPUS IZTACALA

ALGUNAS TECNICAS APLICADAS CON FINES IDENTIFICATIVOS EN EL AREA FORENSE.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
MARCO ANTONIO / ABAUNZA ALOA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. ALFONSO LUNA VAZQUEZ.



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

266834



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS PADRES

Gracias a mí padre José Humberto Abaunza Yañez y a mí madre Reina Loa Saavedra por su apoyo, enseñanza y consejo en mi entender de la vida. Este trabajo es el producto de la formación personal y profesional que en mí forjaron.

### A MI ESPOSA ELOISA VALDEZ R.

Agradezco tú cariño, amor, paciencia, tiempo, dedicación y sobre todo el haberme dado lo que más quiero en la vida: mis 3 hijos.

### A MIS HIJOS

Eloisa Aketzalli: Cuando supe que dios me premiaba contigo, sentí en mí corazón una inmensa alegría, por lo que me propuse superarme para darte lo mejor de mí ser.

Marco Antonio y Enrique mis dos pequeños varones, mis más dulce inspiración: En su descendencia continua el apellido Abaunza, llévenlo con orgullo y humildad.

Que este trabajo sea un ejemplo para ustedes de esfuerzo, tenacidad y optimismo.

### A MIS HERMANOS

Por el apoyado de forma directa o indirecta de mis acciones y decisiones hasta sus consecuencias y una de ellas es este trabajo.

### A MAMÁ MARY

Estoy seguro que te hubiera gustado estar presente en la presentación de este trabajo, donde quiera que estés mil gracias.

### A MIS ABUELOS

Ricardo, Carmen, Quirina y Luis, se que aun en el cielo me han guiado, han intercedido ante el señor por cada paso errado que cometí, gracias por seguir mi causa.

Gracias a los sinodales por la revisión de este trabajo, que sin sus sabios consejos no tendría validez, ni importancia en nuestra escuela.

A la Bióloga Irma Dueñas por su gran interés en esta área, además tengo la plena seguridad que lo difundirá entre la comunidad de Biólogos.

Gracias al QFB. Alfonso Luna Vasquez : por darme el honor de integrarme a su equipo, por ver en mí un futuro prometedor y sobre todo por brindarme su amistad.

Al Biólogo Carlos Carriedo Rico pionero entre los biólogos en la investigación pericial. Gracias por su confianza .

A la Bióloga Susana Ramírez que con sus sabios consejos me orientó y ubicó en el área. Gracias por su ternura y paciencia.

Al Dr. Ricardo Garcia Cavazos por su gran humanidad, humildad y sencillez gracias por asesorarme durante mi tercera etapa de la carrera.

Una vez en la carrera estuve a punto de arrojar la toalla, Quise darme por vencido, si no hubiera sido por sus palabras de aliento que usted me brindó, no habría llegado este momento, muchas gracias maestra Laura Castañeda.

A mis compañeros de laboratorio Gloria, Gaby, Tere, Violeta, Estela, Rayo, Raúl, Arturo, Carlos, Manuel, Gracias por su compañerismo y tolerancia.

Elena Abarca, MA. Eugenia Ambriz, Lourdes Vega, Jorge Guillen, Dr. Castillo Medina Yo creo que en la formación personal y profesional existen personas que se desvelan, sufren, se preocupan y lloran contigo, pero los momentos malos no son eternos, porque también existe el momento en el que disfrutas y gozas de su compañía, donde rebasas las fronteras de la amistad y llegas a la hermandad, donde estas dispuesto a morir en la raya con ellos, das todo y no pides nada a cambio excepto su amistad a todos les agradezco con todo mí corazón y cuenten conmigo para todo.

A mis amigos que por mucho tiempo llevamos una amistad: Araceli Garcia Morales, Alejandro Rojas, Rolando Palomera, Sergio, Juan Teco, Alma Delia, Jesús Córdoba, Fernando el feote, León Patricio, Dr. Antonio Miranda, a la candidata para Lic. Veronica Rodriguez, Edna Lujan, Tere Maldonado, Claudia Körbert, Fernando Muñoz, Abraham Rubio, Luis Espinoza, Luy Quijada, Memo Aguilar y de aquellos que por descuido no menciono, gracias por su amistad.

## INDICE

	PAGINA
A).-INDICE	1
B).-RESUMEN	2
C).- BIOGRAFIA DEL SUSTENTANTE.	3
D).-INTRODUCCION	5
E).- JUSTIFICACION	11
F).-OBJETIVOS	11
G).-APLICACIONES:	
G.1).-CASO NUMERO 1	12
G.2).- CASO NUMERO 2	20
H).-CONCLUSION DEL TRABAJO	27
I).-APENDICE	28
J).-BIBLIOGRAFIA	31

## RESUMEN

*Una de las estrategias que se sigue en la carrera de biología en su tercera etapa del plan modular es que el alumno se integre de manera temprana al ámbito profesional y productivo, siendo de este modo que ingresé al laboratorio de Genética del Hospital General de México. Posteriormente ingresé al laboratorio de Genética Forense de la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal bajo la asesoría y el adiestramiento del químico Luna, tuve la oportunidad de conocer el área legal, que me ha permitido participar en la evaluación de la evidencia. Para el estudio de la evidencia con la finalidad de obtener la identidad del probable responsable, se crearon las Ciencias Forenses, las cuales han colaborado en la administración de la justicia, la criminalística, se encarga del análisis de los indicios y evidencias que son elementos que se encuentran íntimamente relacionados con un presunto hecho delictuoso. En una primera etapa de análisis se aplican técnicas sencillas y rápidas, a estas pruebas se les llama orientativas, después se procede a realizar la prueba confirmativa. La etapa de la identificación y confrontación de características altamente específicas, como es el caso de los marcadores genéticos, permiten comprobar el origen de la evidencia biológica cuando se confronta con las mismas características del presunto responsable. En esta etapa se aplican las técnicas más sofisticadas que existen en el área de la identificación como es el estudio del ADN.*

*La Genética Forense: se define como la ciencia que examina la evidencia dentro del ámbito científico y legal, con todos los mecanismos de implementación de la tecnología de la huella génica por ejemplo: La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se emplea como una estrategia de análisis para la evidencia y se define como una reacción enzimática cíclica, permitiendo analizar la evidencia por medio de los marcadores HLA DQA1, Polymarker y el D1S80.*

*En este trabajo se presentaron dos casos, en uno de ellos se planteó un problema de paternidad y en el segundo fue una violación y homicidio. Para dar respuesta a lo anterior, se aplicó una metodología que se apoya el uso de la herramienta que se emplea en nuestro laboratorio de genética forense. Con los resultados obtenidos se pudo ubicar la conducta delictiva de los implicados.*

## BIOGRAFIA DEL SUSTENTANTE

*Uno de los principales objetivos que se persigue en la carrera de biología de la ENEP Iztacala, en su tercera etapa del plan modular, es que el alumno se integre de manera temprana al ámbito profesional y productivo.*

*Conociendo este antecedente mi objetivo principal fue adentrarme al área de Genética Humana. Ingresando a la sección de morfogénesis del servicio de Genética del hospital General de México bajo la dirección del Dr. Ricardo García Cavazos, mi instancia en este laboratorio abarcó los dos primeros módulos de la tercera etapa. Durante este periodo las actividades que se realizaron fue la de identificar malformaciones en recién nacidos para caracterizar síndromes y a su vez emplear técnicas de citogenética.*

*Con la experiencia adquirida ingrese al Laboratorio de Genética Forense de la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal en la fecha del 27 de Enero de 1992, quedando de manera formal bajo la dirección del Químico Alfonso Luna Vásquez.*

*Bajo la asesoría y el adiestramiento del químico Luna, tuve la oportunidad de conocer el área legal en algunos de sus aspectos más importantes, como la evaluación de indicios, en virtud de que éstos son la única relación entre el probable hecho delictuoso y el presunto responsable (cuando se comprueba que el material es significativo para esclarecer el delito, el indicio recibe la categoría de evidencia).*

*La primera técnica que aprendí, fue la evaluación de la fosfatasa ácida de origen prostático y la búsqueda de células espermáticas en los casos de violación.*

*Mi primera etapa de entrenamiento en la identificación comienza en el laboratorio en 1992, cuando se aplicó por vez primera la técnica denominada "secretores y no secretores del sistema ABO".*

*Por mi desempeño e interés en el área, el 16 de septiembre de 1992 se me da la oportunidad de ingresar como Perito en materia de Genética Forense, convirtiéndome en ese momento en el primer Biólogo a nivel Nacional que ocuparía tal cargo, como representante de la parte oficial y quedando adscrito al Laboratorio de Genética de la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal. En este año se trabajaron 847 casos de violación utilizando la Técnica de la Fosfatasa Ácida así como la visualización al microscopio y 100 casos para secretores y no secretores del sistema "ABO".*

*Es en 1993 cuando se adquiere el material y equipo para mi adiestramiento en las técnicas de Extracción Amplificación e Hibridación del Ácido desoxirribonucleico (ADN), utilizando dos sistemas de marcadores genéticos de aplicación Forense HLA DQA1 y Polymarker, esto apoyado con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). en este año se trabajaron 1092 casos de violación utilizando la prueba de Fosfatasa Ácida y 300 en los que se utilizó la prueba de secretores y no secretores.*

En 1994 se inaugura oficialmente el Laboratorio de Genética Forense, apartir de este momento la técnica de ADN se utiliza como una herramienta en procesos legales, en la individualización y confrontación genética en el área y forense. Con un poder de discriminación combinada reportada por Perkin-Elmer del .9998 para la población Hispanica que habita en los estados unidos. En este año se trabajaron 1168 casos de violación utilizando la Fosfatasa Ácida con la visualización al microscopio para búsqueda de células. Espermaticas y 200 utilizando la prueba de secretores.

En 1995 se incluye en el estudio del ADN el séptimo marcador Genético, llamado D1S80. Con este marcador el poder de discriminación se incrementa dándonos una mayor confiabilidad, sumando los tres sistemas genéticos. Perkin-Elmer reporta que el poder de discriminación combinado es del .999982 para la población Hispanica que habita en los estados unidos. En este año se trabajaron 1273 casos de violación utilizando la Fosfatasa Ácida y 90 para la prueba de secretores.

En 1996 y 1997 se trabajaron 2040 Y 1492 casos de violación respectivamente utilizando la Fosfatasa Ácida así como la búsqueda de espermatozoides.

De 1994 hasta 1997 el banco de datos se incremento con muestreos en la población del Valle de México y a estas fechas se han trabajado con la técnica de ADN 2037 Averiguaciones Previas relacionadas con violación, homicidios, paternidad, robo de infante, secuestro, identificación de personas etc., Todos estos casos caracterizados en el área Legal.

## INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad de crear una metodología para el estudio sistemático de las evidencias en hechos delictuosos y con la finalidad de obtener la identidad del probable responsable, se crearon las Ciencias Forenses. (Neufeld 1990).

Desde entonces, la ciencia ha colaborado en la procuración y administración de la justicia, siendo el testimonio científico el factor decisivo para la resolución de problemas legales.

El análisis científico de huellas dactilares, sangre, semen, pelos y otros indicios de origen físico encontrados en la escena del crimen, pueden ser más convincentes para un juez, que la declaración de un testigo ocular. Por tal motivo la comunidad científica forense vigila la investigación sometiendo las nuevas teorías y descubrimientos a extensas revisiones y verificaciones independientes con el fin de que el resultado redunde en la obtención de la verdad histórica de los hechos.

En un proceso penal los adversarios presentarán opuestas opiniones de expertos, dejando en manos del juez la evaluación crítica de la evidencia, tomando con base a los fundamentos científicos, una resolución determinada.

El objetivo principal de un proceso es descubrir la verdad de un hecho criminal, con el fin de ubicar la conducta delictiva, creando una información clara y precisa para ubicar al presunto ejecutor del hecho.

La investigación de un probable hecho delictuoso es una de las actividades que realiza el Organismo Jurisdiccional, con la finalidad de proporcionar una adecuada administración y procuración de justicia y se apoya de tres disciplinas:

A).-La criminalística, que se encarga del análisis de los indicios y evidencias, entendiéndose por éstas a todos los elementos que se encuentran íntimamente relacionados con un presunto hecho delictuoso, cuyo estudio permite reconstruir los hechos, e identificar a su(s) autor(es) y establecer su participación. En esta área participan peritos en genética, química, antropología, patología, hematología, balística y dactiloscopia, entre otros. (Montiel 1984, Moreno 1984)

B).-La policilogía, que incluye técnicas, métodos y conocimientos aplicados en la localización, persecución y detención de los presuntos responsables del hecho delictuoso, en esta área participan la Policía Judicial. (Montiel 1984, Moreno 1984)

C).-La criminología, se encarga del estudio del delito como conducta humana y social. investiga las causas de la delincuencia, la prevención del delito y del tratamiento al delincuente. en esta área participan peritos en psicología, psiquiatría y criminología (Montiel 1984)

En un lugar de hechos en casos de homicidios, la sangre de la víctima puede ser encontrada en la ropa del sospechoso; en los casos de violación el violador puede dejar el semen sobre la víctima o bien en las prendas, a tal situación se le conoce como la ley de intercambio, donde el intercambio de cuerpo A en colisión con cuerpo B ambos quedarán impregnados del cuerpo opuesto, siendo posible caracterizar o identificar al dueño o a los dueños de las muestras siendo en ese momento que hablaríamos de la evidencia.

El análisis de la evidencia es realizado de manera multidisciplinaria por expertos de cada área y exige una alta especialización en la materia, el resultado de esta interacción de ciencias nos puede conducir a obtener la identidad del individuo como el infractor del hecho criminal (Moreno 1984).

*La ley permite que expertos calificados testifiquen y expresen su opinión en su materia en la cual son profesionalmente aptos. A tales personas se les conoce con el nombre de peritos (Artículo 162 del Código de Procedimientos Penales para el Distrito Federal.)*

*El perito es la persona que sin ser parte en un proceso, aporta al mismo sus conocimientos científicos, prácticos o técnicos, con el fin de proporcionar al juez la información especializada para valorar o percibir determinado hecho (Neufeld 1990).*

*El dictamen que ofrece el perito es considerado por la ley como un medio de prueba en un proceso y es avalado por el artículo 135 fracción III del Código de Procedimientos Penales para el Distrito Federal.*

*La principal finalidad de las técnicas forenses es la identificación confiable del delincuente. El estudio de antropometría y el retrato hablado juegan un papel importante, pero los sistemas de identificación más utilizados y difundidos son los que se emplean en la dactiloscopia (el análisis de las huellas dactilares), por el hecho de que no existen dos individuos que tengan las huellas idénticas. Sin embargo, la frecuencia de casos en las que son encontradas huellas de buena calidad para que sean utilizadas como elementos significativos de confronta, es extremadamente baja; por lo que en muchas ocasiones la investigación pericial y el proceso legal se veía seriamente bloqueado.*

*Por otro lado, las técnicas convencionales que se emplean para identificar a personas son la dactiloscopia, retrato hablado, antropometría y las señas particulares. Estas se utilizan cuando se quiere identificar individuos íntegros físicamente, sin embargo, estos métodos son insuficientes cuando se requiere identificar cadáveres irreconocible (quemados o mutilados), o cuando se quiere comprobar que algún indicio biológico recolectado de un lugar de hechos (crímenes, asalto con violencia o violación) pertenece o tiene relación con un probable responsable. Tampoco son suficientes en problemas de disputa de paternidad u otros problemas en los que se requiera tener la certeza de la relación biológica entre individuos.*

*Una de las áreas que juega un papel importante en la identificación de los protagonistas de un presunto hecho delictuoso, es la que estudia las características bioquímicas y genéticas de la evidencia biológica por medio de la caracterización de marcadores genéticos.*

*Se entiende por marcador genético, al gen cuya expresión fenotípica generalmente es fácilmente discernida, es usado para identificar un individuo o célula que lo lleva, o bien como prueba para marcar un núcleo, cromosoma o locus. (King and Stansfield 1990.)*

*Otra definición sería la siguiente: es un sistema basado en la expresión alfa numérico de la biomolécula de ADN tanto a nivel de exon como de intron que derivan en la caracterización de un individuo a nivel genotípico y fenotípico y a su vez son heredables dentro de una población.*

*Para que un marcador genético pueda ser aplicado con fines de identificación, es necesario que se le consideren algunas propiedades que estén involucradas tanto en la naturaleza del marcador como el método de análisis.*

*Metodología para el análisis:*

- 1.- Debe ser rentable, rápido y sencillo de realizar.
- 2.- Debe tener la capacidad de reconocer diferencias entre los alelos aún cuando éstas sean mínimas.
- 3.- Debe ser reproducible

#### *Naturaleza del marcador:*

- 1.- Debe de heredarse de manera independiente a otros marcadores.
- 2.- Deben de ser polimórficos y con un elevado grado de heterocigocidad.
- 3.- Se requiere tener un banco de datos de la población, tanto de las frecuencias como su distribución alélica, con el fin de conocer la potencia de dicho marcador en la identificación del infractor.

Tradicionalmente se han estudiado los productos génicos (proteínas), o bien el resultado final de la catálisis de los productos génicos (grupos sanguíneos) por medio de técnicas inmunológicas o bioquímicas que suponen integridad tanto estructural como funcional de dichos productos. Sin embargo, existen grandes limitaciones para evidenciar la presencia de un marcador determinado si se analiza su expresión fenotípica, debido a los efectos que ejercen los factores ambientales sobre ellos, tal es el caso del calor, humedad, temperatura, radiación, así como la alteración estructural y fisiológica de estos marcadores causada por las bacterias y hongos, entre otros y halladas con frecuencia en el lugar de hechos. El análisis se ve seriamente limitado a muestras frescas que conserven íntegras las características susceptibles a ser estudiadas, quedando fuera de toda posibilidad el estudio de muestras envejecidas y degradadas.

La aplicación de la genética para la tipificación del ADN ha ido consolidándose (sin eclipsar el uso de los marcadores a nivel de proteínas) en la identificación forense. La teoría se basa en un método desarrollado para estudiar las enfermedades hereditarias, con el doble propósito identificar los genes causantes de enfermedades en familias portadoras de un trastorno congénito y predecir el riesgo de un individuo cuando se conoce el gen causante.

Con la participación de la genética en la evaluación de la evidencia, estudiando directamente el ADN, en casos de paternidad, homicidios y violación entre otros, se crea una nueva línea de investigación a la que se le dio el nombre de Genética Forense.

Es difícil dar una definición precisa de la Genética Forense porque en ella se deben abarcar aspectos científicos, tecnológicos y legales que necesariamente convergen en el diario que hacer del investigador forense especializado en el área. Sin embargo, es posible dar un punto de vista muy personal avalado por la experiencia de 5 años de trabajo en esta disciplina:

La Genética Forense es una rama auxiliar de la Criminalística que se basa en el estudio de la transmisión de los caracteres hereditarios, dentro del contexto de un proceso legal. Se apoya de los avances científicos y tecnológicos con el fin de precisar con un alto grado de confiabilidad la relación biológica entre la evidencia encontrada en la escena del crimen y el presunto infractor.

La Genética Forense ha evolucionado muy rápidamente después del descubrimiento de la huella genética. Ofrece obvias ventajas sobre el análisis de las proteínas. En primer lugar, la tipificación por ADN puede aplicarse a muestras pequeñas, deterioradas o envejecidas; en segundo lugar, goza en comparación de los marcadores genéticos de mayor certeza y confiabilidad; y por último, si consideramos que solo el 5% del genoma se expresa en proteínas, con la tipificación del ADN es factible analizar, en teoría el 100% del mismo, e incluso estudiar aquellas muestras que no rinden información proteica como huesos y dientes.

La tipificación del ADN, involucra directamente el análisis de la estructura del gen deseado. La confiabilidad del estudio de esta biomolécula radica justamente en la gran diversidad alélica inscrita en los genes. Esta diversidad alélica recibe el nombre de polimorfismo. Cuando en un gen se identifican dos o más variantes alélicas se dice que el gen es polimórfico. Existen dos tipos de polimorfismos, los de secuencia y los de longitud. (BARRERA 1992.)

A).-Los polimorfismos de secuencia: En estos polimorfismos la variación se da en el cambio de una base por otra en una secuencia de longitud constante de ADN.

B).-Polimorfismos de Longitud: A estos polimorfismos también se les conoce como minisatelites o VNTR. Consisten de una secuencia de bases de nucleótidos que se repite en bloques o tandem a lo largo del genoma, el tamaño varia de 14-100 pb; también existen los microsátelites cuya secuencia de bases es menor en tamaño. Los VNTR se encuentran localizados de forma dispersa en el genoma humano, a muchos de ellos se les puede caracterizar en los intrones (secuencia de bases de ADN que no codifican para proteína). El estudio de ellos en poblaciones humanas ha permitido observar un alto grado de heterocigocidad a nivel de alelos, debido a esto es muy difícil encontrar a dos personas con los mismos alelos.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se emplea como una estrategia para el análisis forense del ADN dado por su sensibilidad y especificidad, Se puede emplear para el análisis de los polimorfismos de sitio y los de longitud.

La PCR es una reacción enzimática cíclica, en la cual las hebras del ADN son copiadas, donde los productos del primer ciclo de las hebras del ADN copiadas son usados como substratos del siguiente ciclo, y así sucesivamente permitiendo incrementar exponencialmente una región deseada. (SARDELLI, 1993)

El proceso de la amplificación ocurre en tres fases: La desnaturalización del ADN genómico, la alineación de los oligonucleótidos y la extensión de los iniciadores por medio de la ADN Polimerasa.

El éxito de esta técnica depende de la amplificación o multiplicación de un fragmento deseado del ADN, que permite obtener muestras en cantidad suficientes para estudiar una secuencia específica. A Kary B. Mullis le fue otorgado el premio novel de química en 1993 gracias al diseño de este sistema de multiplicación. (MULLIS 1991)

El proceso de amplificación se lleva a cabo en ciclos. Cada ciclo consta de tres etapas técnicas:

1).-La desnaturalización del ADN genómico con una temperatura de 92° a 96°C. La doble cadena se abre a estas temperaturas y la hebra simple servirá como molde para la etapa de la alineación.

2).-La alineación los oligonucleótidos también conocido como iniciadores (que son una molécula sintética de ADN de cadena sencilla que tiene la finalidad de detectar un gen específico) se unen a la secuencia molde a una temperatura de 45° a 72°C.(los oligos se pegan a las hebras)

3).-la extensión de los iniciadores por medio de la ADN polimerasa a 72°C. En este paso la ADN polimerasa complementa la cadena problema en dirección 3'-5' con la adición sucesiva de nucleótidos (dNTP's) siendo así que se genera la cadena complementaria, por lo que se complementa el ciclo, formando un duplicado en el número de copias del ADN molde empezando a partir de donde fueron unidos los cebadores y el éxito de este proceso es el que por cada ciclo se obtendrán como productos nuevas hebras complementarias de una forma exponencial.

La PCR es una técnica que se basa en la actividad enzimática, los medios disponibles para formar nuevas cadenas del ADN blanco y los cambios de temperatura.

En nuestro laboratorio la metodología que se aplica en el proceso de identificación de una muestra considerada como evidencia plantea un orden lógico de estudio y parte desde las técnicas más sencillas y rápidas hasta las más complejas y específicas y en todos los casos, orienta al científico forense en la caracterización de una evidencia hasta su grado máximo de individualización (Ver diagrama de flujo 1).

La serie de resultados que arroja una prueba, nos permite asignar una categoría de análisis de la evidencia. De esta forma, una prueba es llamada orientativa cuando los resultados nos permiten establecer la presencia o ausencia de elementos. Por citar un ejemplo en los casos de violación, se recurre a la identificación del semen por medio de una prueba de orientación: la evaluación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida de origen prostático. Esta enzima se encuentra en todos los fluidos biológicos en bajas cantidades, pero en el plasma seminal se detecta en altas concentraciones. Con base a lo anterior, la rapidez con la que se identifica el producto nos orienta sobre el origen de la enzima

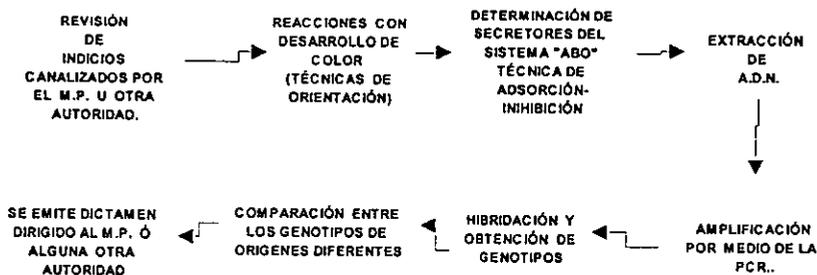


diagrama de flujo 1.- metodología aplicada al estudio de la evidencia en el lab. De Genética.

Quando las pruebas de orientación son positivas, se procede a realizar la "prueba confirmativa", volviendo al ejemplo de la búsqueda de semen es importante, la observación microscópica de células espermáticas. Debido a que comúnmente los espermatozoides pueden ser confundidos con cualquier fibra proveniente del algodón del hisopo ó de la tela, se hace uso de una técnica de Tinción llamada "Christmas tree". Se trata de una Tinción diferencial en virtud de que uno de los colorantes tiene afinidad por el ADN del espermatozoide (rojo), mientras que el de contraste tiene afinidad por el resto de la célula. El patrón de Tinción rinde imágenes de espermatozoides cuya cabeza se tiñe de rojo, mientras que el resto de la célula se tiñe de verde.

La presencia de una célula espermática en un frotis, confirma la existencia de semen en una evidencia pudiendo recurrir a una forma de tipificación, siendo de las más sencillas la tipificación a través de los antígenos del sistema "ABO". La cual consiste en buscar los antígenos de grupo secretados en los fluidos biológicos principalmente semen y saliva. Aun cuando no se a llegado con esta técnica a su nivel máximo de la identificación nos ha permitido excluir o no excluir a probables sospechosos en el estudio. En la población del Valle de México se describe que el 70% secreta en sus fluidos biológicos los antígenos del sistema "ABO" y el 30% restante no lo secretan, sin embargo, en estudios recientes realizados en el Hospital Centro Medico Nacional, habla de que la proporción es de 90% de los que si secretan y 10% a los que no secretan(Aguilar, 1993.)

Regresando a la metodología aplicada al estudio de la evidencia, la etapa de la identificación y confronta de características altamente específicas, como es el caso de los marcadores a nivel proteicos y genéticos, permiten comprobar el origen de la evidencia biológica cuando se confronta con las mismas características del o los presuntos responsables. En esta etapa se aplican las técnicas más sofisticadas que existen en el área de la identificación como es el estudio del ADN.

Para el estudio del ADN se emplea en este laboratorio los marcadores genéticos de aplicación forense HLA-DQA1 PCR amplification and Typing Kit<sup>®</sup>, localizado en el cromosoma 6 con seis posibles alelos y como producto de PCR de 239/242 pares de bases; el sistema Polymarker<sup>®</sup> PCR amplification and Typing Kit con el locus LDLR ubicado en el cromosoma 19 con 2 alelos como producto de PCR de 214 pares de bases; el locus GYPA ubicado en el cromosoma 4 con 2 alelos como producto de PCR de 190 pares de bases, el locus HBGG ubicado en el cromosoma 11 con 3 alelos como producto de PCR de 172 pares de bases; para el locus D7S8 ubicado en el cromosoma 7 con 2 alelos como producto de PCR de 151 pares de bases; para el locus GC ubicado en el cromosoma 4 con 3 alelos como producto de PCR de 138 pares de bases; D1S80<sup>®</sup> PCR amplification and Typing Kit<sup>®</sup>, localizado en el cromosoma 1 con 29 posibles alelos y como producto de PCR de 16 pares de bases en tandem.

En 1969 Brock y Freeze aislaron al *Thermus aquaticus* (YT1) de un Geiser en Yellow Stone National Park.

En 1976 Chien y sus colaboradores caracterizan la enzima Taq ADN polimerasa.

En 1984 Karis Mullis diseña la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

*En 1985 se publica por primera vez la aplicación de la técnica en la diagnosis prenatal de células anémicas.*

*En 1986 se realizaron 20 publicaciones sobre la aplicación de esta nueva técnica.*

*En 1989 se realizaron 860 publicaciones sobre las diferentes aplicaciones de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.*

*En 1993 las publicaciones se extendieron aproximadamente a 500 por mes. En ese año a Kary Mullis se le otorga el premio japonés así también el premio novel de química.*

*En 1994 se describió para la técnica de la PCR el empleo de las Polimerasas termoestables que permiten la amplificación de secuencias largas de ADN de 40 kb.*

## JUSTIFICACIÓN

*En el área legal se realiza la búsqueda de mejores estrategias de identificación para obtener la identidad del probable responsable del hecho criminal, anteriormente algunas técnicas de identificación se aplicaban a nivel proteico, de las cuales la confiabilidad y la interpretación en algunas ocasiones no eran concluyentes. En la actualidad existen técnicas de identificación a nivel genético a través del Ácido desoxirribonucleico (ADN) que permite obtener la identidad del infractor del hecho. La utilización de los marcadores genéticos con aplicación forense HLA-DQA1 PCR amplification and Typing Kit<sup>®</sup>, Polymarker<sup>®</sup> y D1S80<sup>®</sup>. Permite dar una mejor interpretación de una evidencia y con llevar a la mejor impartición de justicia. En este sentido en la República Mexicana y sobre todo en el Distrito Federal se han realizado pocos trabajos que permitan conocer de manera específica como el biólogo ha participado en la evaluación de la evidencia desde el punto de vista de la Genética Forense, aplicando toda la herramienta que implique determinado estudio, por tal motivo en este trabajo se busca crear el interés del biólogo para que incremente su participación Científico y Metodológico en la resolución de probables hechos delictuosos.*

## OBJETIVOS

- 1.-. Crear el interés del biólogo para que incremente su participación Científico y Metodológico en la resolución de probables hechos delictuosos.*
- 2.-Mostrar en este trabajo, la estrategia que se sigue para la evaluación de la evidencia en el área de la genética forense.*

*En 1985 se publica por primera vez la aplicación de la técnica en la diagnosis prenatal de células anémicas.*

*En 1986 se realizaron 20 publicaciones sobre la aplicación de esta nueva técnica.*

*En 1989 se realizaron 860 publicaciones sobre las diferentes aplicaciones de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.*

*En 1993 las publicaciones se extendieron aproximadamente a 500 por mes. En ese año a Kary Mullis se le otorga el premio japonés así también el premio novel de química.*

*En 1994 se describió para la técnica de la PCR el empleo de las Polimerasas termoestables que permitían la amplificación de secuencias largas de ADN de 40 kb.*

## JUSTIFICACIÓN

*En el área legal se realiza la búsqueda de mejores estrategias de identificación para obtener la identidad del probable responsable del hecho criminal, anteriormente algunas técnicas de identificación se aplicaban a nivel proteico, de las cuales la confiabilidad y la interpretación en algunas ocasiones no eran concluyentes. En la actualidad existen técnicas de identificación a nivel genético a través del Ácido desoxirribonucleico (ADN) que permite obtener la identidad del infractor del hecho. La utilización de los marcadores genéticos con aplicación forense HLA-DQA1 PCR amplification and Typing Kit<sup>®</sup>, Polymarker<sup>®</sup> y D1S80<sup>®</sup>. Permite dar una mejor interpretación de una evidencia y con llevar a la mejor impartición de justicia. En este sentido en la República Mexicana y sobre todo en el Distrito Federal se han realizado pocos trabajos que permitan conocer de manera específica como el biólogo ha participado en la evaluación de la evidencia desde el punto de vista de la Genética Forense, aplicando toda la herramienta que implique determinado estudio, por tal motivo en este trabajo se busca crear el interés del biólogo para que incremente su participación Científico y Metodológico en la resolución de probables hechos delictuosos.*

## OBJETIVOS

- 1.-. Crear el interés del biólogo para que incremente su participación Científico y Metodológico en la resolución de probables hechos delictuosos.*
- 2.-Mostrar en este trabajo, la estrategia que se sigue para la evaluación de la evidencia en el área de la genética forense.*

*En 1985 se publica por primera vez la aplicación de la técnica en la diagnosis prenatal de células anémicas.*

*En 1986 se realizaron 20 publicaciones sobre la aplicación de esta nueva técnica.*

*En 1989 se realizaron 860 publicaciones sobre las diferentes aplicaciones de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.*

*En 1993 las publicaciones se extendieron aproximadamente a 500 por mes. En ese año a Kary Mullis se le otorga el premio japonés así también el premio novel de química.*

*En 1994 se describió para la técnica de la PCR el empleo de las Polimerasas termoestables que permitian la amplificación de secuencias largas de ADN de 40 kb.*

## JUSTIFICACIÓN

*En el área legal se realiza la búsqueda de mejores estrategias de identificación para obtener la identidad del probable responsable del hecho criminal, anteriormente algunas técnicas de identificación se aplicaban a nivel proteico, de las cuales la confiabilidad y la interpretación en algunas ocasiones no eran concluyentes. En la actualidad existen técnicas de identificación a nivel genético a través del Ácido desoxirribonucleico (ADN) que permite obtener la identidad del infractor del hecho. La utilización de los marcadores genéticos con aplicación forense HLA-DQA1 PCR amplification and Typing Kit<sup>®</sup>, Polymarker<sup>®</sup> y DIS80<sup>®</sup>. Permite dar una mejor interpretación de una evidencia y con llevar a la mejor impartición de justicia. En este sentido en la República Mexicana y sobre todo en el Distrito Federal se han realizado pocos trabajos que permitan conocer de manera específica como el biólogo ha participado en la evaluación de la evidencia desde el punto de vista de la Genética Forense, aplicando toda la herramienta que implique determinado estudio, por tal motivo en este trabajo se busca crear el interés del biólogo para que incremente su participación Científico y Metodológico en la resolución de probables hechos delictuosos.*

## OBJETIVOS

- 1.-. Crear el interés del biólogo para que incremente su participación Científico y Metodológico en la resolución de probables hechos delictuosos.*
- 2.-Mostrar en este trabajo, la estrategia que se sigue para la evaluación de la evidencia en el área de la genética forense.*

## APLICACIONES CASO NUMERO UNO

Los siguientes hechos sucedieron en la ciudad de Morelia, Michoacán, en el año de 1995. Alrededor de las cinco horas del día 27 de junio, la señora María Cleofas, de 32 años de edad, con nueve meses de gestación, de familia humilde, dedicada al hogar, casada con un jardinero y madre de tres hijos; salió de su casa, hacia la Conasupo, como era costumbre, a comprar la leche. El mencionado expendio se encuentra a unas cuadras de su domicilio.

Su esposo y sus hijos esperaban su regreso a las seis de la mañana. Al percatarse de la demora de María Cleofas, dos horas más tarde iniciaron su búsqueda entre los vecinos. El resultado fue que nadie la vio en el expendio de leche. La búsqueda se intensificó y se extendió hacia los hospitales mas cercanos. Este esfuerzo fue infructuoso, por lo que se decidió hacer la denuncia de su desaparición ante la Agencia del Ministerio Público de la Procuraduría del Estado.

En los primeros días del mes de octubre, casi tres meses después; una pareja de enamorados encontró un cuerpo sin vida del sexo femenino en una zona semiboscosa de Guanajuato. Impresionados por el hallazgo dieron parte a la policía del estado con la consecuente intervención de la Procuraduría General del Estado de Guanajuato. El cuerpo se encontraba en avanzado estado de putrefacción. Presentaba una herida vertical en el abdomen y huellas de lesiones en diferentes partes del cuerpo; dos heridas producidas por arma punzocortante en el cuello a nivel de la yugular: una profunda y otra superficial; golpes en la cara y marcas en las muñecas y tobillos. Los resultados de la necropsia de ley sugirieron que la herida abdominal había sido producida por un bisturi como consecuencia de una cesárea. Sin embargo, no se encontró el producto de la gestación ni la placenta y el análisis forense estableció que todas las lesiones descritas se provocaron antemórtem.

La Procuraduría de Guanajuato no logró identificar el cadáver, pero tenían conocimiento de la desaparición de una mujer en la ciudad de Morelia cuyas características podrían tener alguna relación con el hallazgo, por lo que se entabló comunicación entre ambas Procuradurías.

La Procuraduría de Michoacán solicitó al jardinero que acudiera a reconocer algunas pertenencias del cadáver, las cuales identifique por pertenecer en vida a su esposa y posteriormente reconoció el cuerpo.

Las investigaciones continuaban para localizar al producto, con la idea de relacionar al o a los presuntos homicidas de la occisa.

Ubicándonos en la fecha del primero de julio de 1995, en otra parte de Morelia, una enfermera con especialidad en Gineco-Obstetricia con varios años de experiencia, dio a luz en su casa, de donde salió corriendo pidiendo ayuda, llevaba en la mano una placenta ensangrentada y con la otra cargando a un bebé desnudo, recorrió 4 cuadras bastante largas, al tiempo que gritaba que su hijo se le había venido en el baño de su casa. Ante tal circunstancia fue auxiliada por policías preventivos que la trasladaron a un Hospital del Seguro Social del Estado. Ante tal lugar la enfermera no permitió que los médicos en turno la revisaran, solo fue revisado el menor, el cual se encontraba en perfectas condiciones de salud, por lo que ese mismo día fue dado de alta.

Ante la negativa de la enfermera para ser revisada y por las condiciones del nacimiento del menor los médicos encargados de esa guardia solicitaron la intervención del Ministerio Público. Esté ordenó a los peritos criminalistas acudir al lugar de hechos, sin que tomaran las muestras de sangre que se encontraron en las paredes del pasillo, del baño, del piso y de la puerta que daba a la salida de la calle; días después se ordeno el rastreo hemático a los químicos, siendo imposible que se pudieran tomar las muestras pues el lugar estaba completamente limpio.

A la enfermera no se le demostró ningún delito determinándose que no existía evidencia alguna para levantar cargos en su contra.

En el mes de octubre se relacionó la averiguación de la señora Cleofas cuando fue encontrado e identificado su cadáver, con la averiguación de la enfermera, dado que en el testimonio del marido declaro que una señora embarazada y otro señor de un Volks-Wagen de color verde le daban "raid" a su esposa de la Conasupo a su casa, y le regalaba ropa y juguetes para sus hijos, otros testimonios de señoras que frecuentaban la conasupo declararon que el día de los hechos vieron que la ahora occisa se subió al Volks-Wagen y era conducido por la enfermera, ante estas declaraciones el Juez obligó a la enfermera a hacerse un estudio de ginecología, en el que se dio por resultado que la señora al menos en ocho meses no había tenido trabajo de parto, y como antecedente la enfermera tenia un año aproximadamente que había formado una mola en su vientre, el menor tenía tres meses de edad, por lo que se penso que no era la madre biológica.

La enfermera quedó sujeta a investigación y hasta ese momento las pruebas condenatorias formaban un 50% y las absolutorias el otro 50%, en apoyo a la enfermera intervino derechos humanos por lo que más probable era que saliera libre.

La Procuraduría General de Justicia de Michoacán solicito a otras procuradurías llevar a cabo la prueba del Acido Desoxirribonucleico (ADN); La Procuraduría de Guadalajara les informo que las técnicas de ADN se realizan en la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal.

Este caso fue estudiado y trabajado por el personal adscrito al Laboratorio de Genética Forense de la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal.

La petición de estudio solicitaba:

- 1.- Realizar la exclusión de paternidad (utilizando las técnicas de ADN) entre la pareja conformada por la Occisa que en vida llevo el nombre María Cleofas, su esposo y el menor de tres meses de edad.
- 2.- Realizar la exclusión de paternidad (utilizando las técnicas de ADN) entre la pareja conformada por la Enfermera, el esposo y el menor de tres meses de edad.

Para dar respuesta a tal petición se planteo la siguiente metodología:

## METODOLOGIA APLICADA

Se tomaron 5ml de sangre (con anticoagulante EDTA al 0.5% en tubos de Vacutainer), a la enfermera y su pareja, así como del menor y del marido de la Occisa María Cleofas. A la Occisa se le tomaron dos piezas dentales y cuero cabelludo, bajo la fe del Juez y del Ministerio Publico, todas las muestras fueron transportadas en hielo, para ser analizadas en el Laboratorio de Genética Forense del D.F.

En el laboratorio, las muestras de sangre, las piezas dentales y el cuero cabelludo fueron registradas y etiquetadas de acuerdo a un orden de secuencia establecido para nuestro trabajo.

Para la extracción del Acido Desoxirribonucleico a partir de la sangre, se recurrió al protocolo de "LIFE CODES", que consiste en aislar el ADN de un mililitro de sangre total, utilizando un detergente llamado "amortiguador de lisis celular" que tiene la finalidad de disolver los lípidos que se encuentran en la membrana celular," después se agregó un amortiguador para la lisis de proteínas presentes en membranas más resistentes como son las nucleares y por ultimo se utilizó una enzima llamada proteinasa "K" la que con su actividad enzimática digiere todo tipo de proteínas a una temperatura de 56 grados centígrados, la finalidad que se persigue es aislar el ADN de proteínas y lípidos (Para detalles de la técnica Ver apéndice 2.).

El cuero cabelludo, se lavó con Extran alcalino al 10%, y se dejó en agitación durante 12 Hrs., después de este tiempo, se lavó el tejido con agua de la llave, posteriormente con agua estéril y alcohol al 96% y por ultimo se dejó secar. Para la extracción del Acido Desoxirribonucleico, se recurrió a una técnica adaptada a las condiciones del laboratorio, donde el cuero cabelludo es fragmentado con bisturí en porciones pequeñas y es sometido a soluciones amortiguadoras de digestión (como detergente para disolver membrana), también se utilizó Ditiotreitrol (DTT) que es un agente reductor el cual convierte los enlaces de disulfuro en sulfhidrido en las proteínas (-S- en -SH-) facilitando la función de la proteinasa "K".

Las piezas dentales se colocaron con una mezcla de etanol-agua al 70%, para evitar el crecimiento Bacteriano y por ultimo se dejaron secar por unos minutos. Para la extracción del Acido Desoxirribonucleico del diente, este fue fragmentado y colocado en tubos falcón, a este se adicionaron la solución amortiguadora y la proteinasa K de tal modo que se produjo la digestión sobre las irrigaciones sanguíneas que llegan a las terminaciones nerviosas de la raíz.

La purificación del ADN de todas las muestras procesadas, se basó en la utilización de una mezcla de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico(25:24:1), el fenol desnaturaliza proteínas, el cloroformo elimina toda traza de fenol y el alcohol isoamílico desplazaría los residuos del fenol cloroformo de la fase acuosa, la mezcla de las tres soluciones forman una sola fase llamada orgánica en donde encontramos lípidos, la siguiente fase sería donde encontramos las proteínas y la última fase es donde encontramos el ADN disuelto en agua, esta última se transfirió a un tubo nuevo y el ADN se precipitó con alcohol frío y por ultimo se disuelve en buffer TE pH8 que es un estabilizador con el fin de evitar la degradación del ADN. (Para detalles de la técnica ver apéndice 3).

Para corroborar que efectivamente se logró la extracción del ADN, se sometió a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8%, donde las muestras problema y el ADN testigo (de concentración conocida) se colocaron en pozos separados. Una vez terminado el corrimiento se tiñó con Bromuro de Etidio y por último se visualizó con un Transiluminador de UV, por medio de la comparación de la intensidad de fluorescencia se determinó la cantidad y concentración de ADN en la muestra problema. De aquí se tomó el criterio de la cantidad que se utilizó para la amplificación.

La amplificación del ADN se logró por medio de la técnica de La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los marcadores genéticos que se emplearon para este estudio, se basan en el protocolo del Kit de amplificación forense HLA-DQA1 PCR Amplification and Typing Kit®, Polymarker® y D1S80®, empleando un termociclador modelo 480 de la marca Perkin Elmer, usando un rango de 1 a 20 ng de ADN genómico según sea la sensibilidad del sistema utilizado. Se incluyeron controles positivos y negativos de amplificación para cada uno de los análisis. La reacción consistió de 32 ciclos de amplificación para los sistemas genéticos Polymarker y HLA-DQA1 para todas las muestras considerando las temperaturas de desnaturalización a 90° por 30 segundos, temperatura de unión a 60° por 30 segundos y temperatura de extensión a 72° durante 30 segundos y un último ciclo de extensión por 10 minutos a 72°. (Para detalles de la técnica ver apéndice 4).

Para el sistema genético D1S80 se procedió a amplificar la muestra basándose en el rango de 1 a 10 ng de ADN genómico, los tiempos y temperaturas variaron de acuerdo al protocolo establecido para el sistema, con temperatura de desnaturalización de 90° durante 1 min, temperatura de unión a 65° por 1 min. y temperatura de extensión a 72° por 1 min. y un ciclo adicional de 72° de extensión durante 10 minutos. Se incluyeron controles positivos y negativos de amplificación (Para detalles de la técnica ver apéndice 4).

Los productos de la amplificación de cada una de las muestras se verificó corriendo un gel de agarosa al 4%, teñido con bromuro de etidio 1 mg/ml, para que su valoración se realice en un Transiluminador de UV, corriendo los controles positivos y negativos se someten a un corrimiento en geles de agarosa al 4%, a un voltaje de 100 volts, en los productos de amplificación de los sistemas HLA-DQA1 y Polymarker, se observaron las bandas características de cada uno de los marcadores y en geles de poliacrilamida al 0.5%, para los productos de amplificación del D1S80. El voltaje sólo varió para corrimiento de los geles de poliacrilamida en los cuales se empleó un voltaje de 300 volts.

La Hibridación de los productos obtenidos de la amplificación para la determinación de los alelos presentes en el sistema de HLA-DQA1 el sistema Polymarker, el cual incluyó los cinco marcadores genéticos: Receptores de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDLR), Glicoforina A (GYPA), Hemoglobina Gamaglobina (HBGG), Locus D7S8 y Componentes de Grupo Específico (GC); los cuales fueron hibridados basándose en el proceso inverso al "Dot-Blot" llamado "reverso de Dot-Blot" el cual consiste en la unión de Productos de amplificación de ADN genómico (productos de PCR) sobre sondas sobrepuestas en membranas de nylon, cada una de éstas sondas (de una secuencia específica) detecta seis alelos para

HLA-DQA1 definiendo 21 posibles genotipos y el sistema Polymarker detecta 12 alelos con 930 genotipos. En el proceso de la hibridación se utilizan sondas no radiactivas en las cuales tendremos secuencias de ADN específico que al ponerse en contacto con los ADN productos se realiza la hibridación y el revelado se realiza con una enzima biotinilada.

La molécula de biotina se encuentra covalentemente unida a la región 5' terminal del primer contenido en la mezcla de reacción, en donde cada hebra del ADN amplificado es marcada con una molécula de biotina. El ADN amplificado el cual es retenido en cada punto específico de la sonda puede ser detectado por esa marca de biotina. El ADN biotinilado es detectado en la sonda durante el paso de desarrollo de color usando un conjugado de estreptavidina con una enzima peroxidasa (llamado reactivo de enzima conjugada) La estreptavidina se une a la biotina con una alta afinidad y especificidad. La enzima peroxidasa cataliza la oxidación soluble incolora del llamado tetrametilbenzidina (TMB) a un producto insoluble de color azul determinando una mancha. Esta mancha permanece sobre la sonda o membrana, identificando un punto positivo dentro de la misma indicando la captura de los alelos complementarios con esa sonda.

Una vez determinados los alelos se procedió a su interpretación genotípica y se tomó fotografía de ellos.

Para la interpretación de los alelos del sistema D1S80 se llevó a cabo un corrimiento electroforético en gel vertical de Poliacrilamida al 0.5%. a 300 volts durante 3 horas, cada una de las muestras amplificadas fue mezclada con azul de bromofenol y depositada en el pozo alternando una muestra con un control de peso molecular conocido como ladder, en el cual van incluidos los alelos determinados en este sistema, los cuales al correrse determinan el patrón alélico y genotípico en las muestras. Una vez finalizado el corrimiento electroforético, el gel se vertió en el recipiente con Bromuro de etidio 1mg/ml, durante 15 minutos para revelar los alelos amplificados. Una vez enjuagado el gel, se procedió a interpretar el gel directamente al espectro ultravioleta tomando como referencia el marcador alélico con controles de peso molecular conocidos (ladder), para este sistema se detectan 29 alelos que definen un total de 435 genotipos. La determinación alélica se hizo de manera directa anotando de igual forma los genotipos y procediéndose a tomar fotografías de cada uno de los geles. Con los datos obtenidos de esta metodología se rinden los siguientes:

## RESULTADOS GENOTIPOS

NOMBRE	HLA	EDLR	GYRA	HBGG	D7S1	AGC	D1S80
OCCISA MA. CLEOFAS	4,4	AA	AA	BB	AA	AB	29,30
ESPOSO DE LA OCCISA		AA	AA	BB	AB	BC	27,25
MENOR EN DISPUTA	4,4	AA	AA	BB	AA	BC	25,30
LA ENFERMERA		BB	AB	AA	AB	BC	21,21
ESPOSO DE LA ENFERMERA	1,1,3	AA	AA	BB	BB	CC	16,18

## ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

1.-De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían de la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (4,4) y el esposo (4,4) para el sistema HLA-DQ A1 serían: 4,4 únicamente.

El menor presenta el genotipo 4,4 para el sistema HLA-DQA1. genotipo obtenido se encuentra dentro de la combinación esperada

2.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (A,A) y el esposo (A,A) para el sistema Polymarker en el locus LDRL serían: A,A únicamente.

El menor presenta el genotipo A,A para el locus LDRL, del sistema Polymarker. El genotipo obtenido se encuentra dentro de la combinación esperada

3.-De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (A,A)

y el esposo (A,A) para el sistema Polymarker en el locus GYP A serían: A,A únicamente. El menor presenta el genotipo A,A para el locus GYP A, del sistema Polymarker. El genotipo obtenido se encuentra dentro de la combinación esperada

4.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (B,B) y el esposo (B,B) para el sistema Polymarker en el locus HBGG serían: B,B únicamente.

El menor presenta el genotipo B,B para el locus HBGG, del sistema Polymarker. El genotipo obtenido se encuentra dentro de la combinación esperada

5.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (A,A) y el esposo (A,B) para el sistema Polymarker en el locus D7S8 serían: A,A y A,B solamente.

El menor presenta el genotipo A,A para el locus D7S8, del sistema Polymarker. El genotipo obtenido se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

6.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (A,B) y el esposo (B,C) para el sistema Polymarker en el locus GC serían: A,B; B,B; A,C y B,C.

El menor presenta el genotipo B,C para el locus GC, del sistema Polymarker. El genotipo obtenido se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

7.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la occisa María Cleofas (29,30) y el esposo (24,25) para el sistema D1S80 serían: 24,29; 24,30; 25,29 y 25,30.

El menor presenta el genotipo 25,30 para el sistema D1S80. El genotipo obtenido si se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

I.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían de la descendencia de la pareja formada por la enfermera (1,1,3) y su esposo (1,1,3) para el sistema HLA-DQ A1 serían: 1,1, 1,1; 1,1,3 y 3,3.

El menor presenta el genotipo 4,4 para el sistema HLA-DQA1. el genotipo obtenido no se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

II.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la enfermera (B,B) y su esposo (A,A) para el sistema Polymarker en el locus LDRL serían: A,B únicamente.

El menor presenta el genotipo A,A para el locus LDRL, del sistema Polymarker . El genotipo obtenido no se encuentra dentro de la combinación esperada

III.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la enfermera(A,B) y su esposo(A,A) para el sistema Polymarker en el locus GYPA serían: A,A y AB únicamente

El menor presenta el genotipo A,A para el locus GYPA, del sistema Polymarker . El genotipo obtenido se encuentra dentro de la combinación esperadas.

IV.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la enfermera (A,A) y su esposo (B,B) para el sistema Polymarker en el locus HBGG serían: A,B únicamente.

El menor presenta el genotipo B,B para el locus HBGG , del sistema Polymarker . El genotipo obtenido no se encuentra dentro de la combinación esperada

V.- De acuerdo a las probables combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la enfermera (A,B) y el esposo (B,B) para el sistema Polymarker en el locus D7S8 serían: A,B y B,B solamente.

El menor presenta el genotipo A,A para el locus D7S8, del sistema Polymarker. El genotipo obtenido no se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

VI.- De acuerdo a las combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la enfermera (B,C) y el esposo (C,C) para el sistema Polymarker en el locus GC serían: BC y CC.

El menor presenta el genotipo B,C para el locus GC, del sistema Polymarker . El genotipo obtenido se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

VII.- De acuerdo a las combinaciones de alelos, los genotipos que se esperarían en la descendencia de la pareja formada por la enfermera(21,21) y el esposo (16,18) para el sistema D1S80 serían:16,21 y 18,21 únicamente.

El menor presenta el genotipo 25,30 para el sistema D1S80. El genotipo obtenido no se encuentra dentro de las combinaciones esperadas.

*La exclusión de una pareja como padres biológicos de un menor se realiza en el momento en el que la combinación de los alelos presentes en el genotipo del menor no concuerda con los genotipos determinados para los probables progenitores. La combinación de alelos paternos y maternos presentan características codominantes, por lo que la combinación de éstos alelos siempre estará presente en el genotipo del menor, si es el caso de que realmente es hijo biológico de la pareja en cuestión.*

### CONCLUSIÓN

**1.-Basandose en los resultados obtenidos de los marcadores genéticos aplicados (HLA DQA1, Polymarker y D1S80) la pareja formada por la enfermera y su esposo se excluyen como madre y padre biológicos del menor de tres meses de edad.**

**2.-Basandose en los resultados obtenidos de los marcadores genéticos aplicados (HLA DQA1, Polymarker y D1S80) la pareja formada por la occisa María Cleofas y su esposo no se excluyen como madre y padre biológicos del menor de tres meses de edad.**

*Como resultado final a este estudio comparativo a nivel de alelos, la enfermera y su esposo fueron excluidos como padres biológicos del menor, por lo que la enfermera fue consignada por homicidio doloso con agravantes y robo de infante.*

*Al marido se le dio una condena menor quedando comprobado que hubo complicidad, aunque demostró que el día de los hechos estuvo fuera del estado.*

*Al concluir las investigaciones la enfermera declaró que si realizó la cesarea, pero que no utilizó algún anestésico y al terminar sacrificó a María Cleofas.*

*Por informes de los familiares se supo que la enfermera tenía problemas para poderse embarazar y presentó una mola, en la gestación ésta fue entregada al marido y éste la enterro, sin embargo la pareja tenía dos hijas, por lo que se continuaría investigando si en verdad eran hijos de la enfermera y su marido.*

## SEGUNDO CASO

Los siguientes hechos sucedieron en la Ciudad de México en el año 1995, siendo aproximadamente las 12 A.M. del día 2 Octubre, Jorge "G." recibió en su trabajo un llamado telefónico de una persona de voz del sexo masculino, el cual con insultos amenazó que apartir de una hora violaría y mataría a la novia de Jorge "G", lo reto a que intentara detenerlo y sin mas palabras le colgó.

Jorge "G." desesperado trato de hablar por teléfono a la casa de su novia para tratar de advertirle el peligro que le acechaba, todo fue en vano por que nunca le contestaron, por lo que salió de su trabajo que se ubicaba al norte de la Ciudad y se dirigió a la casa de la novia que vivía en la delegación Coyoacán, al llegar a la casa de la novia, tocó la puerta, no recibió respuesta alguna, angustiado se brinco la barda, al estar en el jardín de la parte frontal de la casa se percató que la puerta de la casa se encontraba abierta, entró a la sala-comedor y de ahí se dirigió al segundo nivel donde se encontraban las recamaras, sin encontrar a nadie, por lo que penso que la novia y su futura suegra hablan salido, siendo entonces esto una broma de muy mal gusto, penso, de tal modo que se tranquilizo y por el trago amargo se dirigió a la cocina para tomar un vaso de agua, al entrar descubrió que en el suelo yacía el cuerpo ensangrentado de su suegra, al tratar de auxiliarla se percató que está muerta, por lo que pide ayuda a la policia, es así como interviene el agente del Ministerio Publico.

Al llegar al lugar de los hechos el M.P. acordonó el área y procedió a realizar una revisión total de la casa con el fin de encontrar indicios relacionados a este hecho, fue en el baño del primer nivel de la casa donde encontró el cuerpo sin vida de Tere "M." quien era la novia de Jorge "G.", el M.P. solicito la intervención de peritos en diferentes especialidades con el fin de dar esclarecimiento a este doble homicidio.

Se determinó que la puerta de la casa no había sido forzada, en la cocina donde fue encontrado el primer cuerpo existía evidencia de lucha donde la occisa fue atacada por objeto contundente al parecer con las características de un martillo, por la mecánica de los hechos se sugería que había sido atacada sexualmente y después fue asesinada, por lo que se le tomaron muestras de cavidad vaginal y fueron enviadas al Laboratorio de Genética Forense para la identificación de semen. En el segundo cadáver, se notó que su muerte fue provocada con un objeto punzo cortante muy probablemente con un cuchillo en el lugar que fue localizado el cuerpo se encontraron restos de materiales empleados en la construcción.

Los resultados de la necropsia realizada en el Servicio Medico Forense indicaron que Tere "M" tenia tres meses de gestación.

### PETICION DE ESTUDIO:

El día 3 de Octubre, se reciben en el Laboratorio de Genética Forense las muestras de cavidad vaginal, varias prendas de vestir, pertenecientes a Tere "M" y su mamá en cuya petición se solicito, un rastreo seminologico para determinar la posible presencia de semen.

*Para dar respuesta a tal petición se planteo la siguiente metodología:*

### **METODOLOGIA APLICADA PARA LA BUSQUEDA DE SEMEN**

*En la realización del rastreo seminológico de las muestras de cavidad vaginal, así como las prendas que vestían las víctimas, se considero la posibilidad de contar con la presencia de semen, éstas muestras siguieron dos pasos fundamentales en el análisis de evidencias forenses; las pruebas de orientación y la de confirmación*

*A.- Prueba de orientación: la evaluación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida de origen prostático. Esta enzima se encuentra en todos los fluidos biológicos en bajas cantidades, pero en el plasma seminal se detecta en altas concentraciones, esta es una prueba de orientación en la cual se produce una reacción química con desarrollo de color, donde un sustrato llamado Alfa Naftil Fosfato reacciona con la enzima, de aquí se libera un compuesto llamado naftol que reacciona con el Dianizil Tetrazolio el cual producirá una coloración violácea, de acuerdo a la intensidad que se produzca se interpreta el origen de esta enzima.*

*B.- Prueba de confirmación. Se confirma por medio de una visualización al microscopio después de aplicar una tinción de contraste de coloración llamada "Arbol de Navidad" el cual se encuentra constituido por el reactivo rojo rápido el cual tiñe el núcleo celular del espermatozoide, el citoplasma de células de descamación es teñido por el verde índigo carmín, es así como se puede contrastar el campo problema y evaluar la presencia de espermatozoides.*

**Se obtuvieron los siguientes resultados:**

**1.-En las muestras de cavidad vaginal tomadas a Tere "M" , si se identifico la presencia de semen.**

**1.1.-en las prendas de vestir de Tere "M" no se identifico la presencia de semen**

**2.- En las muestras de cavidad vaginal y varias prendas de vestir, pertenecientes a la mamá de Tere "M" no se identifico la presencia de semen.**

*Hasta esos momentos, sólo se tenían indicios que podrían dar con la identidad del o los victimarios, sin embargo, no existía una prueba clara para inculpar a alguna persona, sólo se tenían sospechosos.*

*De las pesquisas se desprendió que uno de los principales sospechosos de la muerte y violación cometidas contra madre e hija, era Jorge "G", dado que fue la primera persona en llegar al lugar de hechos, por lo que seria la primera línea de investigación.*

*El segundo sospechoso era el ex-novio de Tere "M", cuya relación termino un mes antes y el juro que se vengaría.*

*El tercer sospechoso era un albañil contratado por Jorge "G" para realizar algunas composturas en la fachada de la casa, este albañil no se presento ese dia ni dias posteriores a los hechos, se desconocía su domicilio.*

Con los resultados obtenidos de la primera evaluación por técnicas forense, el Agente del Ministerio Público que llevaba el caso, solicitó la intervención de los peritos en materia de Genética Forense, con el fin de obtener el estado secretor de antígenos del sistema ABO y de igual forma el perfil genético del semen encontrado en la cavidad vaginal de Tere "M" y una vez obtenidos los resultados, compararlos con los principales sospechosos de la muerte y violación cometidas contra madre e hija, para determinar su origen biológico.

#### METODOLOGIA DE SECRETORES Y ADN.

Jorge "G" y el ex-novio de Tere "M" se presentaron al Laboratorio de Genética por ordenes del M.P. para que se les tomaran muestras de sangre y semen, solamente le fueron tomadas al ex-novio de Tere "M",

Jorge "G" se negó a proporcionar las muestras solicitadas por el M.P., justificándose que se encontraba muy nervioso ya que momentos antes le habían aplicado el examen de poligrafía. El sugería que se le tomaran las muestras posteriormente.

ante tal problema le acercamos un cenicero y le ofrecimos un cigarrillo, el cual prendió y consumió, al terminarlo lo deposito en el cenicero. Al retirarse Jorge "G", recogimos la colilla la cual estaba húmeda y se busco células de descamación bucal.

La colilla se dividió en dos porciones una de ellas se resuspendio con solución salina y se agito en vortex con el fin de extraer las células bucales de la colilla, posteriormente se procedió a la extracción del material genético, el fragmento restante fue sometido a la técnica de secretores y no secretores del sistema ABO.

El albañil fue llevado al laboratorio para la toma de muestra de semen y sangre, nos percatamos que en uno de sus zapatos en una de sus agujetas tenia una mancha de sangre la cual fue tomada y procesada.

El semen y la saliva encontrada en colilla de cigarro fueron tipificadas por medio de secretores y no secretores del sistema ABO de acuerdo con la técnica de Adsorción-Inhibición que tiene el fin de buscar los antígenos de grupo secretados en los fluidos biológicos, los antígenos de la muestra problema se pone en contacto con anticuerpos específico (un anti-A, anti-B y lectina que funciona como anti-H) después de formarse el complejo antígeno-anticuerpo, el antisuero que no haya encontrado su antígeno afin formara un complejo con los eritrocitos, como resultado se observa la aglutinación. La interpretación sería que en el tubo que no se haya formado la aglutinación se tomaría como el grupo resultante.

En este caso la saliva depositada en la colilla fue caracterizada como grupo secretor "A", el semen del ex-novio de Tere "M" fue caracterizado como grupo secretor "O", el semen encontrado en cavidad vaginal fue tipificado como grupo secretor "AB" (cabe mencionar que estas muestras se encontraban contaminadas con restos hemáticos de la occisa), las muestras de sangre de la occisa Teresa "M" resultaron grupo sanguíneo "A", el semen del albañil fue caracterizada como grupo secretor "B" y la agujeta fue caracterizado como grupo sanguíneo "A" (para detalles de la técnica ver apéndice 4).

La extracción del ADN de las células de descamación depositadas en la colilla se baso en el protocolo de "PERKIN ELMER" en el cual se utilizo Buffer de digestión y proteinasa "K" y para la purificación del ADN se baso en la utilización de la mezcla Fenol-Clorformo-Alcohol Isoamilico.

La extracción de ADN a partir de semen tomado de la cavidad vaginal de la occisa Tere "M", se baso se en el protocolo de "PERKIN ELMER", en el cual nos permite separar las células vaginales de células espermáticas, por medio de una diferencial de lisis, significa que las células vaginales se lisan en menor tiempo que los espermatozoides, la lisis se logra, utilizando Buffer de digestión y proteinasa "K", después de hora y media se realizan lavados con Buffer de digestión para eliminar el ADN vaginal y se continua la digestión para el espermatozoide con Buffer de digestión y proteinasa "K".

La purificación del ADN obtenido de sangre y semen se baso en la utilización de la mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamilico. Para el ADN de las células de descamación se utilizo una solución saturada de Cloruro de sodio, con el fin de precipitar las proteínas.

Para corroborar que efectivamente se logró la extracción del ADN, se sometió a un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.8%, donde las muestras problema y el ADN testigo (de concentración conocida) se colocaron en pozos separados. Una vez finalizado el corrimiento de las muestras en el gel de agarosa, se somete a tinción con una solución de Bromuro de etidio y por último se visualiza con un Transiluminador de UV, por medio de la comparación de la intensidad de fluorescencia se cualificó y cuantificó el ADN de las muestra problema. De aquí se establece la cantidad que se utiliza para la amplificación.

La amplificación del ADN se logró por medio de la técnica de La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR.) ( para detalles ver apendice 4).

Los sistemas genéticos que se utilizaron para la amplificación forense son HLA-DQ A1, Polymarker y D1S80.

Los producto de la amplificación de cada una de las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 4% con un voltaje de 100 volts, sometido a una tinción con bromuro de etidio 1 mg/ml, para su valoración y visualización con un Transiluminador de UV.

La Hibridación de los productos obtenidos de la amplificación para la determinación de los alelos presentes en el sistema de HLA-DQ A1, el sistema Polymarker, el cual incluyó los cinco marcadores genéticos: Receptores de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDLR), Glicoforina A (GYPA), Hemoglobina Gamaglobina (HBGG), Locus D7S8 y Componentes de Grupo Especifico (GC); los cuales fueron hibridados basándose en el proceso inverso al "Dot-Blot" llamado "reverso de Dot-Blot"

Una vez determinados los alelos se procedió a su interpretación genotípica y se tomó fotografía de ellos.

Para analizar los productos obtenidos por el sistema D1S80 se sometieron a corrimiento electroforético en gel vertical de Poliacrilamida al 0.5%. a 300 volts durante 3 horas. cada una de la muestras amplificadas fue mezclada con azul de bromofenol que tiene la finalidad de servir como peso al ADN amplificado el cual se deposita en el pozo alternando una muestra con un control de peso molecular conocido como ladder, en el cual van incluidos los alelos determinados en este sistema, los cuales al correrse determinan el patrón alélico y genotípico en las muestras. Una vez finalizado el corrimiento electroforético, el gel se vertió en un







## CONCLUSIÓN DEL TRABAJO.

*El área de las Ciencias Naturales en la actualidad ha extendido su campo de aplicación en diferentes ámbitos del quehacer científico. Es así que de acuerdo a las diferentes disciplinas que la conforman se han establecido diferentes criterios científicos y diversas corrientes. En este sentido, el papel fundamental del biólogo, consiste en incursionar en estas áreas acordes a su perfil profesional, consolidándose como un reto el destacar en disciplinas tales como la ecología, taxonomía, bioquímica, biología molecular, paleontología, genética, etc.*

*La aportación de este trabajo se ha circunscrito en aplicar las metodologías empleadas en la genética y la biología molecular en el campo de la Criminalística, la cual como ciencia multi e interdisciplinaria, evalúa evidencias de tipo físico y biológico, en donde los datos que aporta el biólogo forman parte fundamental en la investigación de hechos delictivos. El hecho de enfrentarse a nuevos campos de aplicación de la Biología en áreas ligadas con la procuración e impartición de Justicia, es motivo suficiente para involucrar a profesionistas comprometidos con una sociedad cambiante que requiere de la aportación que la ciencia puede brindar.*

*La evaluación de la evidencia en un laboratorio sigue un patrón de estudio que va de lo general a lo particular, aplicándose técnicas sencillas y rápidas hasta las más complejas y de mayor confiabilidad. En el laboratorio de Genética Forense, especialidad de reciente creación en México, se sigue el mismo patrón de análisis de evidencias, con la aplicación de marcadores genéticos de uso forense destacando entre los más usuales los sistemas HLA DQA1, Polymarker y D1S80. Los valores de poder de discriminación 0.925266, que indica que es la probabilidad de que dos individuos al azar de una población determinada tengan diferentes genotipos y la probabilidad de coincidencia al azar es de uno por diez a la menos siete, esto indica que de cada 10 millones de personas existirán 2 que presentaran el mismo genotipo; Otro apoyo estadístico del cual nos podemos apoyar es el índice de paternidad, el índice de maternidad y el poder de coincidencia específico, para un caso determinado entre otros parámetros. Estos criterios son considerados para poder concluir en un resultado de exclusión o no exclusión, permitiendo al perito dar un aporte confiable en la emisión de su dictamen.*

## APENDICE 1.-SECRETORES Y NO SECRETORES DEL SISTEMA ABO ADSORCION-INIHIIBICIÓN

- 1.-Tomar una muestra del fluido biologico con un volumen aproximado de 500 ul
- 2.-Tomar 100 ul de la muestra y mezclarla con 200 ul de solución salina
- 3.-Colocar 100 ul de la mezcla en tres tubos previamente etiquetados.(A, B y H)
- 4.- Adicionar 50 ul de Antisueros especificos (Anti-A al 10%, Anti-B al 10% y Lectina) a cada tubo
- 5.- Reposar durante 5 minutos con agitación intermedia a temperatura ambiente
- 6.- Agregar 50 ul de sangre o eritrocitos conocidos al 2% (A, B y O)
- 7.- Dejar reposar durante 10 minutos a 37°C
- 8.- Centrifugar la muestra durante 2 minutos a 3500 rpm a temperatura ambiente
- 9.- Interpretar.

## APENDICE 2.- AISLAMIENTO DE ADN DE SANGRE TOTAL "LIFE CODES"

- 1.- Adicionar 1.0 ml de Sangre Total bien mezclada a un tubo de microcentrifuga un EPPEN DORF. Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 5 minutos
- 2.- Cuidadosamente remover el plasma, a excepción de los leucocitos
- 3.- Adicionar 1.0 de Cell Lysis Buffer a tubo, tapar y agitar durante 1 minuto.
- 4.- Centrifugar a 9500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante,
- 5.- Repetir los pasos 3 y 4 en dos ocasiones más.
- 6.- Adicionar 1.0 ml de Protein Lysis Buffer. Vortear para suspender el Pellet.
- 7.- Centrifugar a 4500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante. Situar las muestras en hielo
- 8.- Prepare una mezcla maestra con 225 microlitro de Protein Lysis Buffer y 25 microlitros de Proteinas K por muestra. Vortear para mezclar.
- 9.- Procesar las muestras de la forma siguiente:
  - a) Adicionar 250 microlitro de la mezcla maestra y resuspender la muestra.
  - b) Mezcle bien y sitúe el tubo en un block a 65°C.
- 10.- Después de la adición de la mezcla maestra a la ultima muestra incubar durante 2 hrs., agitando cada 15 ó 20 minutos con el fin de resuspender el Pellet.
- 11.- Después de la incubación, agitar vigorosamente durante 30 segundos y centrifugar a 10000 r.p.m. durante 2 min.
- 12.- Transfiera el sobrenadante a un tubo EPPEN DORF nuevo
- 13.- Cuantificar el ADN

## APENDICE 3.- PURIFICACIÓN DEL ADN

- 1.- Aproxinadamente a 500 microlitros de la muestra problema se le agrega un 1ml de la mezcla de solución de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamilico (25:24:1)
- 2.- Agitar vigorosamente durante 5 minutos
- 3.- Se centrifuga a 2100 r.p.m. durante 10 minutos
- 4.- Se separa la fase acuosa y se coloca en un tubo estéril nuevo.
- 5.- Se precipita el ADN con un volumen igual de Etanol Absoluto frío
- 6.- Centrifugar durante 5 minutos a 5000 r.p.m.
- 7.- Se decanta el sobrenadante y se le adiciona al tubo un volumen igual de Etanol al 70%
- 8.- Se agita por inversión y se vuelve a centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 minutos
- 9.- Se decanta y deja secar a temperatura ambiente
- 10.- El ADN se disuelve el Buffer TE pH 8 o bien en agua estéril libre de endo nucleasas durante toda la noche a temperatura ambiente
- 11.- El ADN extraído se somete a un corrimiento electroforetico en un gel de agarosa al 0.8%

**APENDICE 4.-LA AMPLIFICACION (PCR)**

- 1.-Prender el Termociclador 5 min. antes de usarlo.
- 2.-Agregar en un tubo ependoff de 0.5 ml (previamente etiquetado), 40 microlitros de la mezcla de reacción, para el sistema DQA1 y POLYMARKER, en el sistema D1S80 se agregan 20 microlitros
- 3.-Adicionar 40 microlitros de la solución de MgCl<sub>2</sub> para la mezcla de DQA1 , adicionar 40 microlitros de preimer a la mezcla de POLYMARKER y 10 microlitros
- 4.-Agregar dos gotas de aceite mineral
- 5.-Depositar de 2 a 40 nanogramos de ADN en la fase que se encuentra la mezcla de reacción y cerrar el tubo.
- 6.-Programar el Termociclador (dentro de 30 min. después de ser agregado el cloruro de magnesio) y introducir los tubos.
- 7.-El programa debe estar en la fila No. 24, a las tres siguientes temperaturas para los sistemas DQA1 y POLYMARKER :
  - 94 grados centígrados por un minuto para desnaturalizar el ADN.
  - 60 grados centígrados por 30 segundos para alinear los cebadores
  - 72 grados centígrados por 30 segundos para copiar y extender las hebras por medio de la polimerasa.

Para el sistema D1S80 los tiempos son de un minuto

- 9.- El programa debe ser de 32 ciclos uniéndolo a la fila No. 2 con un periodo de incubación de 72 grados centígrados por 7 min.

Los Kit de amplificación forense HLA-DQA1 PCR Amplification and Typing Kit<sup>®</sup>, Polymarker<sup>®</sup> y el KIT AmpliFLP D1S80<sup>®</sup> se encuentran constituidos por la mezcla de reacción que contiene : los oligonucleótido cebadores, la enzima ADN polimerasa AmpliTaq<sup>®</sup> , la dioxiadenuintrifosfato, dioxiguanintrifosfato, dioxicitosintrifosfato y dioxitiamintrifosfato (dATP, dGTP, dCTP Y dTTP en solución buffer); solución de MgCl<sub>2</sub>,aceite miueral, ADN control (contiene 250 ng/ml de ADN de genotipo conocido),para el kit D1S80 posee el estandar alelico (ladder) constituido por 27 alelos: del 14 y 16 al 41 , El alelo 15 no esta incluido en el ladder. El volumen total de la mezcla de reacción junto con las muestras es de 50 microlitros, 20 microlitros, de la dilución de la muestra de ADN geómico que contiene aproximadamente 5 ng. de ADN , 20 microlitros de la mezcla de reacción y 10 microlitros, MgCl<sub>2</sub>, 5 mM.

**APENDICE 5.-HIBRIDIZACION DQA1.**

- 1.-Programar el Termociclador a la fila No.1 por 95 grados centígrados
- 2.-Etiquetar las sondas
- 3.-Incubar el ADN amplificado en el Termociclador de 3 a 10 min.
- 4.-Preparar la mezcla de la enzima conjugada 27 microlitros y la solución hibridizadora 3.3 ml. por cada sonda
- 5.- agregar 3 ml. de la mezcla a cada sonda
- 6.-adicionar 35 microlitros del ADN amplificado
- 7.-incubar en baño María a 55 grados centígrados con agitación de 50 a 90 r.p.m. durante 20 min.
- 8.-decantar y agregar 10 ml. de solución lavadora.
- 9.- agitar la sonda a temperatura ambiente
- 10.-desechar la solución lavadora y agregar otros 10 ml. de la misma solución a 55 grados centígrados a 50 r.p.m. por 12 min.

- 11.-desechar la solución y agregar 10 ml. de la misma solución a 50 r.p.m. a temperatura ambiente.
- 12.-desechar la solución lavadora y agregar 10 ml. de buffer de citratos a 50 r.p.m. a temperatura ambiente.
13. preparar el revelador de color 10 ml. de buffer de citratos , 110 microlitros de peróxido al 3% , 0.5 ml. de solución cromogéno
- 14.-agregar 10 ml. de la solución reveladora a cada tira y ponerlo en agitación a 50 r.p.m. de 20 a 30 min. hasta .desarrolle el color cada tira
- 15.- lavar la sonda con agua desionizada

#### APENDICE 6.-HIBRIDACION POLYMARKER

- 1.- Etiquetar las tiras.
  - 2.-Agregar 3 ml. De solución hibridizadora para cada tira
  - 3.-Colocar de 20-40 microlitros de ADN amplificado y desnaturalizado (3-10 min. A 95 grados centigrados)
  - 4.-incubar en baño rotatorio a 55 grados centigrados ( 50-90 rpm.) durante 15 min.
  - 5.-Cinco minutos antes de finalizar la incubación preparar 3.3 ml. De solución hibridizadora y 27 microlitros de enzima conjugada por cada tira.
  - 6.-Terminando los cinco minutos de incubación , decantar la solución con el ADN y secar la charola.
  - 7.-Lavar por unos segundos con solución lavadora precalentada.
  - 8.-Decantar y secar perfectamente con papel.
  - 9.-Dispensar 3 ml. De la solución preparada en el paso #5 .
  - 10.-Incubar a 55 grados centigrados por cinco minutos.
  - 11.-Remover la solución y secar la charola.
  - 12.-Dispensar 5 ml. De solución lavadora y lavar por varios segundos, decantarlo y secarlo.
  - 13.-Dispensar 5 ml. De solución lavadora e incubar a 55 grados centigrados por 12 minutos.
  - 14.-Decantar la solución lavadora y secar.
  - 15.-Dispensar 5 ml. De solución lavadora y agitar por varios segundos, decantar y secar.
- #### DESARROLLO DE COLOR
- 16.- Dispensar 5 ml. De buffer de citratos en los pozos de la charola en la cual se encuentra cada tira y colocarlo en un agitador orbital durante 5 min. A temperatura ambiente.
  - 17.-Durante este paso preparar solución reveladora de color por cada tira:
    - 5ml. De buffer de citratos.
    - 5 microlitros de peroxido (H2O2) al 3%.
    - 0.25 ml. De TMB.
  - 18.-Eliminar el buffer de citratos y secar la charola.
  - 19.-Dispensar 5 ml. De solución reveladora de color.
  - 20.-Agitar de 1 a 30 min. En un agitador orbital a temperatura ambiente y cubrir con papel negro.
  - 21.- por ultimo se lavan las tiras con agua destilada y sacar fotografia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Aguilar M.R. *Inmunoematología Aplicada al Banco de Sangre. Sociedad Mexicana de Hematología* 1993. 2:58-61.
- 2.-Baird M., et. al. *Allele Frequency Distribution of Two Highly Polimorphic DNA Sequence in Three Ethnic Groups and It's Application to the Determination of Paternity. American Journal Human Genetics* 1986. 39: 489-501.
- 3.-Bär W. And Hummel K. *DNA Fingerprinting: Its Application in Forensic Case Work. DNA Fingerprinting: Approaches and Aplications. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerlan, 1991.349-355.*
- 4.-Barrera S. H. *Información genética. 1ª Edición México. Colección Ciencia Básica. 1992.pag. 83.*
- 5.-Berumen C. J. *El Análisis del Acido Desoxirribonucleico en la Identificación de Individuos. Ciencia y Desarrollo* 1993, 19: 34-41.
- 6.-Budowle B., Baechetel F., *D1S80 Populatiön Data in Africans, Americans Caucasians, Southeastern Hispanics, and Orientals. J.Forensic Sci. 1994 38-44.*
- 7.-Danchin A. *La Secuenciación de Pequeños Genomas. Mundo Científico, La Recherche* 1992, 13: 376-386.
- 8.-Corney C. T.; Budowle B. *Validation Studies on the Analysis of the HLA DQalfa Locus Using the Polymerase Chain Reaction. Journal of Forensic Science* 1991, 36: 1633-1648.
- 9.-Crick F. M. *The Structural of the Heritary Maternal. Scientific American Science in the 20 th Century* 1991, 3: 82-88.
- 10.-*Código de Procedimientos Penales Para el Distrito Federal 1997 Editorial Porrúa. 52 Edición Colección Porrúa.*
- 11.-Franco M. *Hematología Forense. Porrúa 2a edición México D.F. 1991*
- 12.-Franklin C. *The New Science of Identity. DNA Profiling. National Geographic* 1992, 112-124.
- 13.-Holland P. M. *Detection of specific Polimerase Chain Reaction product by Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of Thermus Aquaticus DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991, 88: 7276-7280.*
- 14.- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et al. *PCR protocolos .A Guide to Methods and Applications. USA Academic Pres,Inc. 1990: 325-336*
- 15.-Jeffrey A.J.; Royle N.J.; Patel I. ET AL. *Principles and Recent Advances in Human DNA Fingerprinting. DNA Fingerprinting: Approaches and Aplications. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerlan, 1991. 1-19.*
- 16.-King R.C. and Stansfield W.D. *Dictinary of Genetics. Fourth Edition Oxford Univesity Press. New York 1990.*
- 17.-Lander E. *DNA Fingerprinting on Trial. Nature* 1989, 339: 501-515.
- 18.-León P.; Rojas E. *Tras las Pistas de las Huellas Genéticas Humanas. Medicina Legal de Costa Rica* 1991, 8: 3-6.
- 19.-Lewis R. *DNA Fingerprinting Witness for the Prosecution. Discover* 1988: 47-52.
- 20.-Licea C.R.A *Análisis de la distribución de las frecuencias alélicas y genotipicas en el locus D1S80 en una muestra de habitantes de la zona metropolitana de la*

- ciudad de México. Tesis para obtener el título de Q.F.B. Universidad Veracruzana, Xalapa Ver.
- 21.-Montiel S. J. *Criminalista* . Tomo 1 Editorial Limusa 1984.
  - 22.-Moreno G.R., *Ensayos Médicos Forenses y Criminalísticos*. Editorial Porrúa S.A. Tercera Edición , México D.F. 1995.
  - 23.-Moreno G.. *Manual de introducción a la criminalística* De. Porrúa 1984
  - 24.-Mullis K. B. *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*. *Scientific American Science in the 20 th Century* 1991, 3: 104-111.
  - 25.-Neufeld P. J.; Colman N. *La Ciencia al Servicio de la Justicia*. *Scientific American* 1990,262 : 6-14.
  - 26.-Parigian M. J. *An ELISA Procedure for the Deteccion of Soluble ABH Blood Group Substance in Semen, Saliva, and Vaginal Sample*. *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 40, No. 1, January 1995, pag.122-125.
  - 27.-Reynolds R.; Sensabaugh G. *Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples Using the Polymerae Chain Reaction*. *American Chemical Society* 1991, 63: 2-15.
  - 28.-Rodríguez C.M. *Bellas ,S. Population Data on the Loci LDRL,GYPA,HBGG,D7S8, and GC in Three Southwest European Populations*. *Juornal of Forensic Scieces*, JFSCA, vol. 41, No. 2, March 1996, pp. 291-296.
  - 29.-Saavedra C. G. *Analisis de la Distribución de las Frecuencias Alelicas y Genotipicas en el Locus D1S80 en una Muestra de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México*. Tesis Para Obtener el Titulo de QFB. UNAM. F.E.S. Zaragoza. 1996.
  - 30.-Sánchez R. M. *Nociones de identificación dactiloscopia*. *Manuales de la escuela de estudios Penitenciarios*. Ministerio de Justicia Madrid, España pag. 15. 1990
  - 31.-Sardelli A. D. *Plateau Effect Understanding PCR Limitation*. *Amplifications: A Forum for PCR Users*, Issue 9, pag. 1-5 (1993)
  - 32.-Salamanca G. F. *Citogenética Humana*. 1a Ed. México: Editorial Médica Panamericana, 1990.
  - 33.-Tandon N.; Mehra N. *HLA Antigens in Asian Indian Patients with Graves Disease*. *Clinical Endocrinology* 1990, 33: 21-26.
  - 34.-Licea C.R.A. *Análisis de la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en el locus D1S80 en una muestra de habitantes de la zona metropolitana de la ciudad de México*. Facultad de Química Farmacéutica Biológica , Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver.1997.
  - 35.-Veville M. *Una Medida Molecular de la Selección Natural*. *Mundo Científico*, La Recherche 1992, 13: 352-354.
  - 36.-Watson J. D.; Crick F. H. *Genetical Implications of the structure of Deoxirribonucleic Acid*. *Nature* 1953, 171: 964-966.
  - 37.-Weetman A. P. *Analysis of HLA DQb and HLA DPb Alleles in Graves Disease by Oligonucleotide Probing of Enzimatically Amplified DNA*. *Clinical Endocrinology* 1990,33: 65-71.
  - 38.-Weinberg A. R. *The Molecules of Life*. *Scientific American Science in the 20 th Century* 1991, 3: 92-101.