



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

Z A R A G O Z A

Identificación de Restos
Humanos por ADN

T E S I N A

Q U E P R E S E N T A :

ANA LILIA CABRERA AVILA

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 2005



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.

IDENTIFICACIÓN DE RESTOS HUMANOS POR ADN



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas que me apoyaron y mostraron interés en mi recorrido por lograr subir un escalón más en esta carrera de la vida.

A mis hijas:

Jennely

Airi

Ashley

por mostrarme día a día que nunca se termina de aprender.

A **Pablo** por demostrarme su amor y su apoyo incondicional y por compartir su vida conmigo.

A mi querida familia por el apoyo y comprensión.

A mis compañeros y amigos en quienes puedo recurrir en cualquier momento y no me abandonan.

A mi madre que es mi mayor pilar y siempre necesitare de su ser.

A mi padre por su apoyo moral y económico.

INDICE

I RESUMEN

II INTRODUCCION

1. Criterios convencionales de identificación humana.

2. La identificación de individuos por técnicas bioquímicas que evalúan el **fenotipo**.

3. La identificación de individuos por técnicas bioquímicas que evalúan el **genotipo**: los análisis de ADN.

4. El ADN en la identificación individual

5. Alternativas de análisis.

5.1 Sistemas basados en diferente longitud de la región variable.

5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

6. Manejo de los restos biológicos en la identificación por ADN.

7. Futuras técnicas.

8. Estudio de casos Forenses.

III OBJETIVOS

IV JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

V DISCUSIONES

VI CONCLUSIONES

VII BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

A mediados de los '80 comienzan a desarrollarse sistemas de identificación de individuos basados en el estudio de polimorfismos de ADN, los cuales reflejan la amplia variación de secuencias localizadas en diferentes regiones del genoma.

La variabilidad de estas zonas radica en diferencias exhibidas por el material genético, en la secuencia nucleotídica misma a través de sustituciones de nucleótidos, o en la distinta longitud generada por una misma secuencia que se repite un número diferente de veces, como fuera demostrado por primera vez por Wyman and White (1980). Comenzaron a ser estudiadas cuando fué posible conocer su localización y desarrollar una metodología adecuada para ponerlas de manifiesto, mediante sistemas de análisis cada vez más precisos y sencillos.

Los primeros trabajos, publicados a mediados de los '80, empleaban fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas, separados electroforéticamente y transferidos a un soporte sólido, el cual se trataba con una "sonda" constituida por secuencias complementarias de las regiones variables, marcada radiactivamente. Por autorradiografía, resultaba posible observar varias bandas, de localización desconocida dentro del genoma, pero que eran características de cada individuo y se heredaban de padres a hijos (Jeffreys et al, 1985a y b).

Si bien las bandas producidas por estas **sondas multilocus** eran muy variables de una persona a otra, los resultados eran difícilmente reproducibles, ya que pequeñas y poco controlables diferencias en la corrida electroforética (voltaje, tiempo, concentración del gel) afectaban en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados.

El descubrimiento de regiones hipervariables del genoma con localización específica (Nakamura et al, 1987) permitió el desarrollo de las **sondas de locus único** que resolverían el problema, posibilitando el estudio de una zona conocida

del genoma que se visualizaba como dos únicas bandas para la condición heterocigota, correspondientes cada una a un alelo, heredado de cada progenitor.

Estas zonas están constituidas por secuencias repetidas, que aparentemente carecen de función como codificantes de proteínas. La menor variabilidad exhibida por estos sistemas de análisis se solucionaba empleando un conjunto de cuatro o más sondas unilocus que evaluaban otras tantas regiones del genoma.

Sin embargo, aún persistía un inconveniente para el empleo masivo de estas metodologías en la práctica forense: las sondas multilocus, y en menor medida las unilocus, requerían un ADN en estado óptimo en cuanto a su integridad, de alto peso molecular, lo cual rara vez ocurre en cadáveres en proceso de La solución llegó con el desarrollo de técnicas de amplificación o "copiado" de porciones de ADN mediante la "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", con las cuales fue posible implementar sistemas de análisis de secuencias más pequeñas ("microsatélites" o "STRs"), pero menos variables que las anteriores. Con el advenimiento de esta nueva técnica, se hizo posible la evaluación de polimorfismos en cuanto a la secuencia nucleotídica de la región variable, además de las diferencias de longitud.

La permanente innovación metodológica exige la actualización y perfeccionamiento de los sistemas validados por la comunidad forense internacional, que cuenta al presente con la posibilidad de evaluar un centenar de regiones variables del genoma.

En su conjunto, el desarrollo de nuevas metodologías de análisis que hacen posible la identificación de individuos, restos humanos y rastros biológicos, constituye una nueva y valiosa herramienta forense.

INTRODUCCION

1.CRITERIOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACION HUMANA

La identificación de individuos

Una de las acepciones de la palabra "Identificar" es "reconocer si una persona es la que se busca". Es decir, se trata de establecer su individualidad determinando aquellos rasgos o conjunto de cualidades que la distinguen de todos los demás y hacen que sea ella misma.

Las cuestiones relacionadas con la identificación de las personas tienen una enorme importancia en Medicina Legal, tanto en el caso de sujetos vivos como de cadáveres.

Conceptos aplicados a personas vivas.

En la identificación de delincuentes, enfermos mentales con amnesia, menores sin documentos, etc., resultan de utilidad las siguientes observaciones, siempre y cuando se cuente con archivos o datos suministrados por otras personas:

Exámenes generales

. Datos fisonómicos: la descripción de los rasgos fisonómicos constituye el medio más simple para la identificación, al que recurrimos en nuestra vida diaria: reconocemos visualmente a las personas cuyas facciones hemos registrado previamente en nuestra memoria.

Existe además una "memoria institucional", como la que poseen el Registro Civil y la Policía, que consiste en un archivo de fotografías de las personas en "documentos de identidad".

. Sexo: su determinación no ofrece dificultades, excepto en casos complejos de hermafroditismo.

. Peso, talla y edad estimadas.

. Sistema piloso: color, tipo y forma de implantación del cabello, o su ausencia.

. Color de ojos y piel.

. Marcas particulares: cicatrices, defectos congénitos, tatuajes y estigmas profesionales.

Huellas dactilares:

Son las impresiones que dejan los pulpejos de los dedos manchados con tinta, sudor u otros líquidos, sobre una superficie pulimentada, constituídos por surcos y crestas que dan lugar a figuras siempre diferentes, gracias a lo cual permiten la identificación de las personas.

Las huellas dactilares se prestan a una clasificación coherente y a su ordenación en archivos de sencilla localización (Galton, 1892; Henry, 1900; Jiménez Jerez, 1913). No se han hallado dos personas en las que sean idénticas, ni aún en los gemelos univitelinos.

Registro de la voz:

La frecuencia y amplitud de las vibraciones de las cuerdas vocales resultan propias e idénticas para cada persona, incluso si se intenta disimular la voz (Kersta, 1962).

Por otra parte, mediante la aplicación de métodos lingüísticos analíticos, es posible obtener indicios sobre la edad, sexo, nivel cultural, ocupación y antecedentes geográficos y étnicos del hablante ("Manual de Ciencias Forenses", FBI).

Trazado caligráfico:

La firma y el trazado caligráfico presentan características propias del ejecutor, que pueden conducir a su identificación comparándolos con los obrantes en archivos o escritos indubitados (Del Picchia, 1993).

Guzmán (1994) afirma que "del mismo modo que no hay dos seres humanos idénticos, tampoco hay dos escrituras idénticas: las peculiaridades físicas y mentales de cada individuo originan personalidades gráficas indiscutiblemente únicas y diferentes unas de otras".

En tal sentido, debe tenerse en cuenta que para la confección de un escrito existen, además de impulsos cerebrales inconscientes, mecanismos motrices muy automatizados que, si bien soportan cambios graduales en el curso de la vida, no hacen perder los elementos básicos de la escritura.

Huellas genéticas:

Desde mediados de la década pasada, el estudio de regiones hipervariables presentes en el genoma humano resulta de gran utilidad en la identificación de individuos, a partir de un registro previo o bien de sus familiares biológicos.

Dado que estas secuencias son heredables, permiten además efectuar estudios de paternidad, a diferencia de los sistemas identificatorios previamente mencionados.

IDENTIFICACIÓN DE CADÁVERES

Cuando se trata de cadáveres recientes, se aplican las mismas observaciones que para individuos vivos, con la obvia exclusión del registro de voz y trazado caligráfico. Con el transcurso del tiempo, se producen una serie de modificaciones que dificultan la identificación.

Las modificaciones post-mortem

Desde el mismo momento de la muerte, comienzan a producirse cambios físicos y químicos, que deben tenerse en cuenta a los efectos de la identificación individual.

Gisbert Calabuig (1991) los clasifica de acuerdo con el efecto más o menos deletéreo sobre el tejido cadavérico en procesos "destructores" o "conservadores".

Procesos destructores del cadáver

. Autólisis:

Es el conjunto de procesos fermentativos anaeróbicos que ocurren en el interior de la célula por la acción de las propias enzimas celulares, sin intervención bacteriana (Laiho and Pentilla, 1981). La necrosis se produce por la liberación al citoplasma de las enzimas contenidas en los lisosomas.

Es el más precoz de los procesos transformativos cadavéricos, siendo sucedido por la putrefacción. A menudo, los fenómenos autolíticos y putrefactivos se superponen en su evolución.

. Putrefacción:

Consiste en un proceso de fermentación pútrida de origen bacteriano (Evans, 1963). Los gérmenes producen enzimas que actúan selectivamente sobre

proteínas, grasas e hidratos de carbono, dando lugar a modificaciones profundas del cadáver que conducen a su destrucción.

Una vez terminado este proceso, sólo persisten las partes esqueléticas de naturaleza calcárea, los dientes, las uñas y los pelos, mientras que las partes blandas se reintegran al ciclo biosférico.

La putrefacción evoluciona en cuatro fases o períodos:

I- Período colorativo o cromático: se produce una mancha verde en la fosa ilíaca derecha, que después se extiende a todo el cuerpo. Se va oscureciendo progresivamente hasta asumir un tono pardo negruzco, a veces con un matiz rojizo por la hemólisis concomitante.

Este período se inicia 24 horas después de la muerte y dura varios días.

II- Período enfisematoso o de desarrollo gaseoso: Se producen gases que desfiguran todas las partes del cadáver: se hinchan visiblemente el tórax, el abdomen y la cabeza, los ojos presentan exorbitismo y la lengua se proyecta al exterior de la boca.

Se origina una circulación sanguínea post-mortem por la contracción del ventrículo izquierdo y por la presión de los gases putrefactivos, permitiendo la observación de la red vascular superficial.

Este período dura entre varios días y un par de semanas.

III- Fase colicuativa: La epidermis se despega de la dermis, formándose ampollas llenas de líquido. Los gases se van escapando y el cuerpo pierde el aspecto "hinchado" característico de la fase anterior.

Este período dura de 8 a 10 meses.

IV- Reducción esquelética: Paulatinamente, a lo largo de 2 a 5 años, todas las partes blandas del cadáver irán desapareciendo. Los elementos más resistentes suelen ser el fibroso, ligamentos y cartílagos, por lo cual el esqueleto permanece unido durante todo este período, aunque al final también llegan a destruirse estos elementos.

Procesos conservadores del cadáver

NATURALES	ARTIFICIALES
Momificación	Conservación transitoria
Saponificación	Embalsamamiento
Corificación	Refrigeración
Congelación	

NATURALES

Momificación: Consiste en la desecación del cadáver por evaporación del agua de sus tejidos, manteniendo sus formas exteriores de un modo notablemente prolongado. El hecho esencial de este proceso radica en la **rápida** desecación del cuerpo, que al privarle de agua hace imposible el desarrollo de los gérmenes, por lo cual detiene e impide la putrefacción ordinaria (Franchini, 1939).

Las circunstancias ambientales favorecedoras de la momificación son: sequedad, calor y aire circulante con facilidad y abundancia. Entre las condiciones individuales merecen citarse la delgadez y la corta edad, por ser en ellos más sencillos los procesos de deshidratación cadavérica.

. **Saponificación:** es un proceso transformativo que conduce a la formación de una coraza grasa, untuosa y viscosa en estado húmedo, pero que después de haberse secado al aire adquiere consistencia dura, granulosa, de color gris blanquecino (Hausman et al, 1970). Debido a que la sustancia poseía propiedades intermedias entre la grasa y la cera, originalmente se le dió el nombre de **adipocira**.

Desde el punto de vista ambiental, favorecen la saponificación la humedad y el obstáculo al acceso de aire, mientras que desde el punto de vista individual lo primordial es la existencia más o menos abundante de grasa en el cadáver.

. **Corificación:** consiste en un embalsamamiento natural, que sólo tiene lugar en cadáveres conservados en ambientes herméticos. La piel adquiere el aspecto y la consistencia del cuero recién curtido, por una marcada desecación de todos los tejidos, con mantenimiento notable de las formas.

. **Congelación:** el frío intenso y prolongado permite la conservación del cadáver en forma prácticamente indefinida. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que una vez producida la descongelación se aceleran los procesos destructores del cadáver.

ARTIFICIALES

. **Conservación transitoria:** Se logra mediante inyección o sumersión en formol y/o con sustancias antisépticas como el sulfato de cinc.

. **Embalsamamiento:** Consiste en una inyección intraarterial generalizada de un líquido fijador y conservador a base de formol, el cual realiza simultáneamente el drenaje de la sangre venosa, complementada con el tratamiento de las grandes cavidades por la introducción del mismo u otro líquido conservador. Se completa con un conjunto de maniobras estéticas sobre las partes que permanecerán visibles dentro del féretro (Lecha-Marzo, 1924).

. **Refrigeración:** Se realiza en cámaras especiales, que mantienen la temperatura alrededor de 4 grados centígrados, con el objeto de retardar los procesos destructores del cadáver con fines forenses o de estudio.

Cómo se identifica un cadáver ?

Ante el hallazgo de restos cadavéricos o huesos aislados, se plantean en la práctica forense varios interrogantes, que se tratan de resolver en forma sucesiva: datación de los restos, diagnóstico de especie y diagnóstico individual.

Datación de los restos:

Se trata de establecer cuándo ocurrió la muerte del sujeto, en base a diferentes criterios (Castellano et al, 1984):

. **Morfológicos:** se estudian las modificaciones post-mortem, que varían en función del tiempo de muerte, de acuerdo a lo reseñado en el capítulo anterior.

. **Químicos:** los huesos antiguos sufren cambios químicos, con degradación putrefactiva gradual de la parte orgánica y enriquecimiento en minerales, que a su vez se intercambian con los del suelo en que se encuentran en contacto.

. **Biológicos:** se estudia la fauna cadavérica, que varía notablemente con el tiempo.

Diagnóstico de especie:

No ofrece dificultad cuando el esqueleto está completo, dadas las notables diferencias anatómicas entre las distintas especies animales (Aznar y Maestre, 1945). Caso contrario, se recomiendan métodos inmunológicos, basados en reacciones antígeno-anticuerpo (Schleyer, 1962), ó análisis de ADN, ya que casi

todas las regiones variables estudiadas en la práctica forense son específicas de material biológico humano.

Diagnóstico individual:

Datos genéricos

Permiten situar los restos dentro de un grupo más o menos amplio de individuos, estableciendo características étnicas, sexo, edad y talla aproximada (Azevedo Neves, 1949; Eliakis et Iordanidis, 1963a,b, 1966).

. Características étnicas: consiste en el estudio antropológico del cráneo, de los índices cefálicos, facial superior, nasal y prognatismo.

. Sexo: es posible morfológicamente cuando se dispone de pelvis, cráneo y/o fémures. Caso contrario, debe analizarse el ADN estudiando secuencias características de los cromosomas X e Y.

. Edad: el sistema óseo experimenta transformaciones muy marcadas en los períodos extremos de la vida, infancia y senectud, pero paulatinos y poco evidentes en las edades intermedias, lo cual limita la exactitud de esta determinación.

. Talla: existe una correlación muy definida entre la talla y la longitud de los huesos largos, que permite un cálculo bastante aproximado. Cuando sólo se cuenta con otros huesos, se emplean tablas de conversión basadas en la proporcionalidad existente entre los distintos segmentos del cuerpo.

Datos individualizadores:

- . Elementos extrínsecos al cadáver: se analizan aquellos objetos que resisten el paso del tiempo sin destruirse, como cinturones, medallas, anillos o relojes.
- . Caracteres patológicos, naturales o traumáticos que afecten el esqueleto.
- . Identidad radiográfica: varios autores han propuesto la medición de parámetros radiográficos con fines de identificación individual, actualmente casi en desuso.

Mayor interés tiene el método desarrollado por Glaister (1945), que consiste en superponer una radiografía del cráneo y cara con una fotografía de la supuesta víctima, ambas a la misma ampliación. Gill et al (1993) realizaron con éxito la superposición en la identificación de miembros de la familia real rusa, asesinados en 1917.

- . Identificación dental: los dientes son las piezas más resistentes del cuerpo a la destrucción tanto física como química. Un estudio detallado permite conocer especie, raza, sexo, talla y edad aproximadas, además de valiosos datos sobre identificación individual (Clement and Sri-Skanda, 1985; Seigal et al, 1975). En este último caso, es imprescindible contar con información dental previa de la supuesta víctima .

Las fuentes de variabilidad en los dientes pueden ser de naturaleza congénita, como la forma y el tamaño; estigmas debidos a profesiones o hábitos, como el color característico en los fumadores; enfermedades graves de la infancia que afectan la formación de la dentina y el esmalte; y la existencia de tratamientos odontológicos.

- . Métodos bioquímicos: los análisis que evalúan el fenotipo, como los grupos sanguíneos, antígenos de histocompatibilidad, proteínas plasmáticas y enzimas

eritrocitarias no suelen ser útiles en la identificación de cadáveres, ya que se alteran rápidamente luego de la muerte.

A partir de mediados de los '80, la detección y el aislamiento de secuencias hipervariables presentes en el genoma humano revolucionaron los criterios de identificación de individuos. La posibilidad de identificar a un sujeto empleando pequeñas muestras de fluidos corporales, como manchas de sangre o semen; o de tejidos, como pequeños fragmentos de piel o bulbos pilosos, ha ampliado, en gran medida, el espectro metodológico de la Bioquímica Forense.

La variabilidad de estas zonas del genoma radica en diferencias exhibidas por el material genético: el ácido desoxirribonucleico (ADN), que pueden reflejarse sea en la secuencia nucleotídica misma a través de sustituciones de nucleótidos, o en la distinta longitud generada por una misma secuencia que se repite un número diferente de veces, como fuera demostrado por primera vez por Wyman and White (1980). Comenzaron a ser estudiadas cuando fué posible conocer su localización y/o desarrollar una metodología adecuada para ponerlas de manifiesto, mediante sistemas de análisis cada vez más precisos y sencillos.

A mediados de los '80, empleaban fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas, separados electroforéticamente y transferidos a un soporte sólido, el cual se trataba con una "sonda" constituida por secuencias complementarias de las regiones variables, marcada radiactivamente. Por autorradiografía, resultaba posible observar varias bandas, de localización desconocida dentro del genoma, pero que eran características de cada individuo y se heredaban de padres a hijos (Jeffreys, 1985).

Si bien las bandas producidas por estas **sondas multilocus** eran muy variables de una persona a otra, los resultados eran difícilmente reproducibles, ya que pequeñas y poco controlables diferencias en la corrida electroforética (voltaje,

tiempo, concentración del gel) afectaban en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados.

El descubrimiento de regiones hipervariables del genoma con localización específica permitieron el desarrollo de las sondas de **locus único** (Nakamura et al.1987) resolvería el problema, permitiendo el estudio de una zona conocida del genoma, que se visualizaba como dos únicas bandas para la condición heterocigota, correspondientes cada una a un alelo.

Estas zonas están constituídas por secuencias repetidas, que aparentemente carecen de función como codificantes de polipéptidos. La menor variabilidad exhibida por estos sistemas de análisis se solucionaba empleando un conjunto de cuatro o más sondas unilocus.

Sin embargo, aún persistía un inconveniente para el empleo masivo de estas metodologías en la práctica forense: las sondas multilocus, y en menor medida las unilocus, requerían un ADN en estado óptimo en cuanto a su integridad, de alto peso molecular, lo cual rara vez ocurre en cadáveres en proceso de descomposición, o en manchas antiguas de fluidos biológicos o expuestas a condiciones ambientales adversas.

La solución llegó con el desarrollo de técnicas de amplificación de porciones de ADN mediante la "reacción en cadena de la polimerasa" o **PCR**, con las cuales fue posible implementar sistemas de análisis de secuencias más pequeñas ("microsatélites"), pero menos variables que las anteriores. Con el advenimiento de esta nueva técnica, se hizo posible la evaluación de polimorfismos en cuanto a la secuencia nucleotídica de la región variable, además de las diferencias de longitud.

Actualmente, la posibilidad de analizar un gran número de ellas permite realizar estudios certeros a partir de material biológico degradado en forma severa.

2. LA IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS POR TECNICAS BIOQUIMICAS QUE EVALUAN EL FENOTIPO.

Las técnicas bioquímicas de identificación de individuos, previas al conocimiento actual del ADN, se basaban en la comparación de productos de expresión de diferentes genes. Estas proteínas, como los antígenos eritrocitarios (grupos sanguíneos), enzimas eritrocitarias, proteínas plasmáticas y antígenos de histocompatibilidad (HLA), son marcadores que se transmiten obedeciendo a las leyes mendelianas de la herencia:

Grupos sanguíneos:

Sus antígenos se hallan en la superficie de los glóbulos rojos, y sus correspondientes anticuerpos forman parte de las inmunoglobulinas del plasma.

Los antígenos del sistema ABO se hallan también en otras células y en fluidos corporales (saliva, orina, semen, leche) en individuos secretores. Al sistema ABO, descubierto en 1901 por Landsteiner, se fueron agregando posteriormente otros, como el RH, MNS, Duffy, Lewis, Kidd, Lutheran, etc. En conjunto, presentan un rango de probabilidad de exclusión (es decir, de excluir la paternidad biológica de padres falsamente alegados), de alrededor del 75 %.

Proteínas plasmáticas:

Las más frecuentemente utilizadas como marcadores genéticos en las pruebas de filiación son la haptoglobina, alfa-1- antitripsina, transferrina, proteínas grupo específicas Gc, orosomucoide, factor B del sistema properdina, fracción C3 del complemento, alotipos Gm y Km, de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas. Su rango de probabilidad de exclusión es de alrededor de 71 %.

Enzimas eritrocitarias:

Las que presentan mayor polimorfismo son la fosfatasa ácida eritrocitaria (EAP), adenilato kinasa (AK), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), fosfoglucomutasa (PGM), esterasa D (EsD), adenosín deaminasa (ADA), fosfogluconato dehidrogenasa (PGD) y glioxalasa (GLO). El rango de probabilidad de exclusión oscila en el 61 %.

Antígenos de histocompatibilidad (HLA):

Están codificados por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, ubicados en los loci A, B, C, D, DR, DQ y DP del brazo corto del cromosoma 6.

Los antígenos HLA-A, B y C están presentes en todas las células nucleadas del organismo; en cambio los HLA-D y R se distribuyen en forma más limitada: sobre linfocitos B, macrófagos, espermatozoides, células de Langerhans, etc.. Presentan en su conjunto un rango de probabilidad de exclusión de aproximadamente 95 %.

Las pruebas de HLA en estudios de paternidad comenzaron a ser aceptadas en las Cortes a partir de principios de los '70, aunque su origen científico se sitúa unos 15 años antes por su utilidad en otra área de la identificación humana: la determinación de la compatibilidad entre dador y receptor de un transplante de órganos.

3. LA IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS POR TECNICAS BIOQUIMICAS QUE EVALUAN EL GENOTIPO:

LOS ANALISIS DE ADN.

ESTRUCTURA Y FUNCION DEL ADN.

En los organismos vivos, la información hereditaria es almacenada en el **ácido desoxirribonucleico (ADN)**, constituyendo éste el material genético primordial, a excepción de algunos virus que almacenan su información genética en el ácido ribonucleico (ARN).

El ADN fué descubierto por Miescher en 1871, pero recién se lo identificó como portador de la información genética a mediados de nuestro siglo (Avery et al, 1944; Hershey and Chase, 1952). En 1953, Watson and Crick (1953a, b) sugieren un modelo tridimensional para su estructura y mecanismo de replicación, confirmados posteriormente.

De acuerdo con el modelo propuesto, el ADN es una molécula bicatenaria, constituida cada cadena por la secuencia de unidades químicas denominadas **nucleótidos**. Cada nucleótido está compuesto por una pentosa, la deoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada.

Los nucleótidos difieren solamente a nivel de las bases nitrogenadas, que son de dos tipos: las **purinas**, representadas por la **guanina (G)** y la **adenina (A)**; y las **pirimidinas**, constituidas por la **citosa (C)** y la **timina (T)**.

A lo largo de la cadena polinucleotídica, los nucleótidos se unen por uniones fosfodiéster, resultando una secuencia alternante azúcar-fosfato y emergiendo las bases nitrogenadas en forma perpendicular a esta estructura.

Las dos cadenas polinucleotídicas dextrohelicoidales, enrolladas sobre un mismo eje, constituyen una doble hélice. Cada una de ellas presenta una orientación de sus puentes fosfodiéster 3'-5' internucleotídicos opuesta a la de la otra, determinándose así el antiparalelismo de las cadenas.

Las bases nitrogenadas de una de las cadenas se aparean, sobre el mismo plano, con las emergentes de la otra cadena. Debido a problemas estéricos, sólo son posibles dos tipos

de apareamiento: A-T y G-C, que son precisamente los que presentan una exacta equimolaridad en todos los ADNs estudiados (Chargaff, 1950). El par A-T está mantenido por dos puentes de hidrógeno, en tanto que el par G-C lo está por tres.

Las bases nitrogenadas son hidrofóbicas, ubicándose en el interior de la doble hélice, en tanto que los azúcares y fosfatos, por estar cargados eléctricamente, están expuestos al contacto con el agua. De esta manera, la estructura del ADN no sólo está mantenida por las uniones puente de hidrógeno, sino también por las interacciones hidrofóbicas generadas cooperativamente al apilarse las bases.

Las dos cadenas de la doble hélice no son idénticas, ni en composición ni en secuencia de nucleótidos, pero sí mutuamente complementarias: enfrentada a una T siempre habrá una A en la otra cadena, así como enfrentada a una C de una cadena siempre habrá una G en la otra y viceversa. Esta complementariedad sólo puede darse en forma antiparalela, presentando una de las cadenas el sentido 5'-3' (determinado por las uniones fosfodiéster internucleotídicas), y la otra el sentido 3'-5'.

El modelo postulado por Watson y Crick sobre la estructura del ADN les permitió proponer, a la vez, un mecanismo de replicación: ya que las dos cadenas son complementarias, durante la replicación podría producirse la separación de las

cadena de la molécula, constituyendo cada una un molde sobre el que se sintetizaría la cadena hija, complementaria.

Como resultado, se obtendrían dos moléculas hijas, constituida cada una de ellas por una cadena parental y una sintetizada usando aquella como molde. Se plantearon así las bases de la replicación semiconservativa del ADN, posteriormente comprobada en forma experimental (Meselson and Stahl, 1958).

4. EL ADN EN LA IDENTIFICACION INDIVIDUAL:

Una revolución en la Bioquímica Forense.

A partir del descubrimiento de polimorfismos hipervariables en el ADN por Wyman and White (1980), y de la posibilidad de emplearlos en identificación humana, lograda por Jeffreys (1985), los rangos de probabilidad de exclusión se incrementaron enormemente, a más del 99,99 %, superando incluso a la aplicación de todos los sistemas anteriores en conjunto.

Reseña histórica

En orden cronológico, puede decirse que el puntapié inicial de los análisis de ADN se produce en abril de 1985, cuando el primer caso judicial es resuelto por aplicación de técnicas moleculares de caracterización de secuencias hipervariables en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Jeffreys et al., 1985a).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las Huellas Digitales Genéticas (HDG) o "DNA-Fingerprinting" permitieron aclarar una disputa por inmigración a Gran Bretaña (Jeffreys et al 1985). Poco tiempo después, una corte civil inglesa acepta la evidencia de ADN en un caso de paternidad discutida.

El debut de esta prueba en la investigación criminal se produce en octubre de 1986, en un caso de homicidio en el que se comprobó la inocencia del principal sospechoso (Gill and Werret, 1987; Wong et al.,1987).

Recién a partir del año 1987, las pruebas de ADN son admitidas como evidencia en las Cortes Criminales de Gran Bretaña y de Estados Unidos.

En 1988 se desarrollan técnicas de amplificación de ADN de pequeñas regiones variables del genoma, partiendo de sólo 1700 células diploides, equivalentes a unos 10 nanogramos de ADN (Saiki et al, 1988).

Estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* ("Polymerase Chain Reaction" o PCR), emplean iniciadores o **primers**, que son secuencias de ADN complementarias de las zonas flanqueantes de la zona de interés (Jeffreys et al, 1989), que es amplificado por una ADN polimerasa durante ciclos térmicos adecuados, lográndose millones de copias de la región.

En 1989, y a causa de estudios de dudosa verosimilitud efectuados por la empresa americana Lifecodes Corp. en un caso criminal, se discute en los Estados Unidos la validez científica de estas pruebas para uso forense (Lander, 1989), resultando en una revisión crítica de las técnicas utilizadas por los distintos grupos de investigadores.

En 1990, el U.S. Congress Office of Technology Assessment concluye que la identificación de individuos basada en las pruebas de ADN es científicamente válida, siempre que se disponga de la certeza metodológica de su realización. La estandarización de las mismas ha sido encarada, entre otros, por los laboratorios del FBI.

La razón fundamental de la amplia difusión de estas técnicas estriba en el hecho de que, mientras la serología clásica y los marcadores genéticos evaluables fenotípicamente presentan un número muy limitado de genotipos posibles, el continuo descubrimiento de nuevas regiones hipervariables en el ADN resuelve el problema de la identificación certera de individuos y del establecimiento de vínculos biológicos de parentesco.

En los primeros trabajos con utilización de las técnicas de PCR, si bien resultaba posible evaluar regiones de una muestra de ADN que podía estar muy degradada, la escasa variabilidad entre los individuos componentes de la población general

conspiraba contra la certeza incriminatoria del análisis: era factible que una evidencia coincidiera con un sospechoso por azar, y mucho más aún, que a un padre alegado le fuera atribuída erróneamente la paternidad biológica de un descendiente putativo.

A partir de los ´90, la posibilidad de evaluar un gran número de sitios variables localizados en diferentes zonas del genoma (Edwards et al, 1991), permitió analizar, aunque fuera parcialmente, muestras de tejido humano quemado y en estado de putrefacción.

Posteriormente, la incorporación de un número aún mayor de sistemas hizo posible el establecimiento de vínculos biológicos de parentesco a través de secuencias de ADN de muy pequeño tamaño, con lo cual se logró la identificación de cadáveres momificados, con reducción ósea total o quemados (Penacino and Corach, 1993).

5. ALTERNATIVAS DE ANALISIS

A la luz del conocimiento actual, los sistemas de análisis de ADN pueden dividirse en dos grandes grupos: los basados en diferente longitud de la región variable, debidos a VNTR (Variable Number Tandem Repeats - repeticiones en tandem de número variable), y los basados en diferencias en la secuencia nucleotídica.

Los polimorfismos de longitud pueden ponerse de manifiesto mediante enzimas de restricción (RFLPs) o por amplificación de la región variable. En ambos casos, el resultado observable es similar: diferentes individuos presentan distinta longitud de los fragmentos de ADN obtenidos luego del corte con la enzima de restricción seleccionada o de la amplificación de la región de interés.

5.1 Sistemas basados en diferente longitud de la región variable:

Evaluación de minisatélites:

Los minisatélites son regiones del genoma no codificantes, con más de 600 pares de bases de tamaño. En los que involucran unidades repetidas, cada una presenta, por lo general, entre 12 y pocos cientos de pares de bases. Pueden evaluarse mediante:

Transferencia del ADN a soportes sólidos (técnica de Southern):

Se emplea una sonda o **probe** complementaria de la región hipervariable. Las sondas se clasifican, de acuerdo con la localización y número de sitios que presentan sus secuencias complementarias en el genoma, como:

. **De locus múltiple:** Estas sondas reconocen ("hibridizan") a diferentes regiones del genoma, ubicadas en distintos cromosomas, cuya localización precisa se desconoce, produciendo **DNA-fingerprints** ("huellas digitales genéticas") individuo-específicos sobre una membrana que contiene ADN fragmentado

enzimáticamente y separado por electroforesis. Las bandas obtenidas se heredan mendelianamente, por lo cual provienen en forma aproximada en un 50 % de cada uno de los progenitores.

Entre ellas, las denominadas 33.6 y 33.15, desarrolladas por Jeffreys (1985a) que detectan unos 17 fragmentos variables de DNA por individuo, de entre 3.5 y 20 kilobases, o bien el fago M13, que posee secuencias capaces de generar huellas digitales genéticas (HDG), individuo-específicas (Vassart et al., 1987).

Otro ejemplo de este tipo de sondas lo constituyen los oligonucleótidos, en secuencias repetidas 5 veces CAC/GTG que también son generadores de ***fingerprints*** (Nurnberg et al., 1989).

Si bien son sumamente informativas para caracterizar a un individuo, presentan dos inconvenientes que las hacen inapropiadas para los estudios forenses: por un lado, requieren un ADN en buen estado de conservación, de alto peso molecular, que no suele obtenerse a partir de muestras de interés forense; y por otro, dependen de variables experimentales de difícil estandarización, lo que hace casi imposible reproducir los resultados.

. ***De locus único o locus específicas***: detectan un solo locus hipervariable con una banda por alelo; dada la naturaleza diploide de los humanos, se obtienen patrones de dos bandas (heterocigotas), o patrones de una banda (homocigotas, con alelos de similar tamaño).

Su variabilidad está dada por secuencias que se repiten un cierto número de veces, generándose fragmentos de restricción de diferente tamaño (VNTRs), más grandes cuanto más veces esté repetida dicha secuencia. Son altamente polimórficas, por ejemplo, para la sonda YNH24 se han detectado alrededor de 70 alelos de distinto tamaño en la población mundial.

Cabría esperar que esta multiplicidad produjera una muy alta capacidad resolutive, sin embargo, algunos alelos se encuentran mucho más representados que otros en la población, por lo cual la mayor o menor certeza de los estudios efectuados dependerá de los análisis de las frecuencias poblacionales para cada variante alélica o banda, que presente cada sistema en particular. Estos estudios deben realizarse previamente sobre muestras tomadas al azar de individuos no relacionados, de aquella población de la cual emergen las muestras a ser analizadas.

La certeza del análisis puede incrementarse utilizando un conjunto de varios loci hipervariables (Wong et al, 1987; Smith et al, 1990), lo cual disminuye prácticamente a cero la probabilidad de error.

Southern blot.

Esta técnica consta básicamente de las siguientes etapas:

1. Digestión del ADN con enzimas de restricción tras conseguir extraer un ADN de alta molecularidad.
2. Separación de los fragmentos obtenidos por medio de una electroforesis en gel de agarosa.
3. Desnaturalización de los fragmentos separados y cortados.
4. Transferencia de las cadenas simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon y fijación de las mismas por medio de calor (80°C).
5. Prehibridación con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana.
6. Marcaje de la sonda con nucleótidos radioactivos (^{32}P normalmente).
7. Hibridación de la sonda marcada y desnaturalizada con los fragmentos de ADN fijados a la membrana, y lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda o aquellas que hayan hibridado mal.
8. Revelado en placa radiográfica e interpretación de los resultados.

La Figura 1 resume esquemáticamente los pasos a seguir para el análisis de una muestra con una sonda de locus específico.

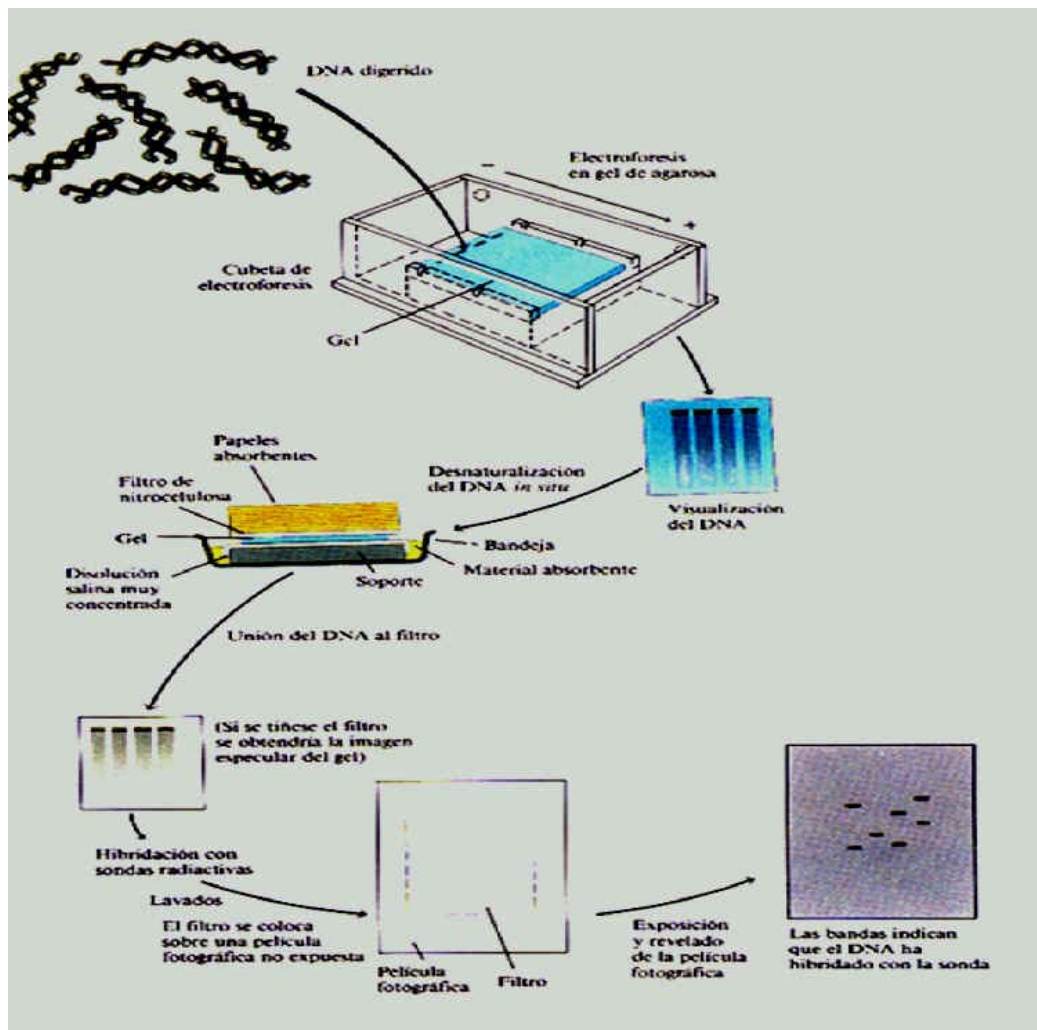


Figura 1

5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR o Polymerase Chain Reaction):

La amplificación mediante PCR requiere pequeñas secuencias de ADN sintético los que actúan como iniciadores o **primers**, que son complementarios de las regiones flanqueantes de la zona de interés. Se produce mediante varios ciclos

(generalmente de 25 a 35), cada uno de los cuales consta usualmente de tres pasos, efectuados mediante cambios de temperatura:

I- Desnaturalización: ruptura de los puentes de hidrógeno, quedando el ADN como simple cadena.

II- Reasociación o ***annealing***: los ***primers*** se reasocian a las zonas complementarias.

III- Extensión: se sintetiza ADN, con los nucleótidos y una ADN polimerasa que se hallan en la mezcla de reacción, generándose al final del proceso millones de copias de la región de interés.

Esquemáticamente, la reacción de amplificación se representa en la Figura 2.

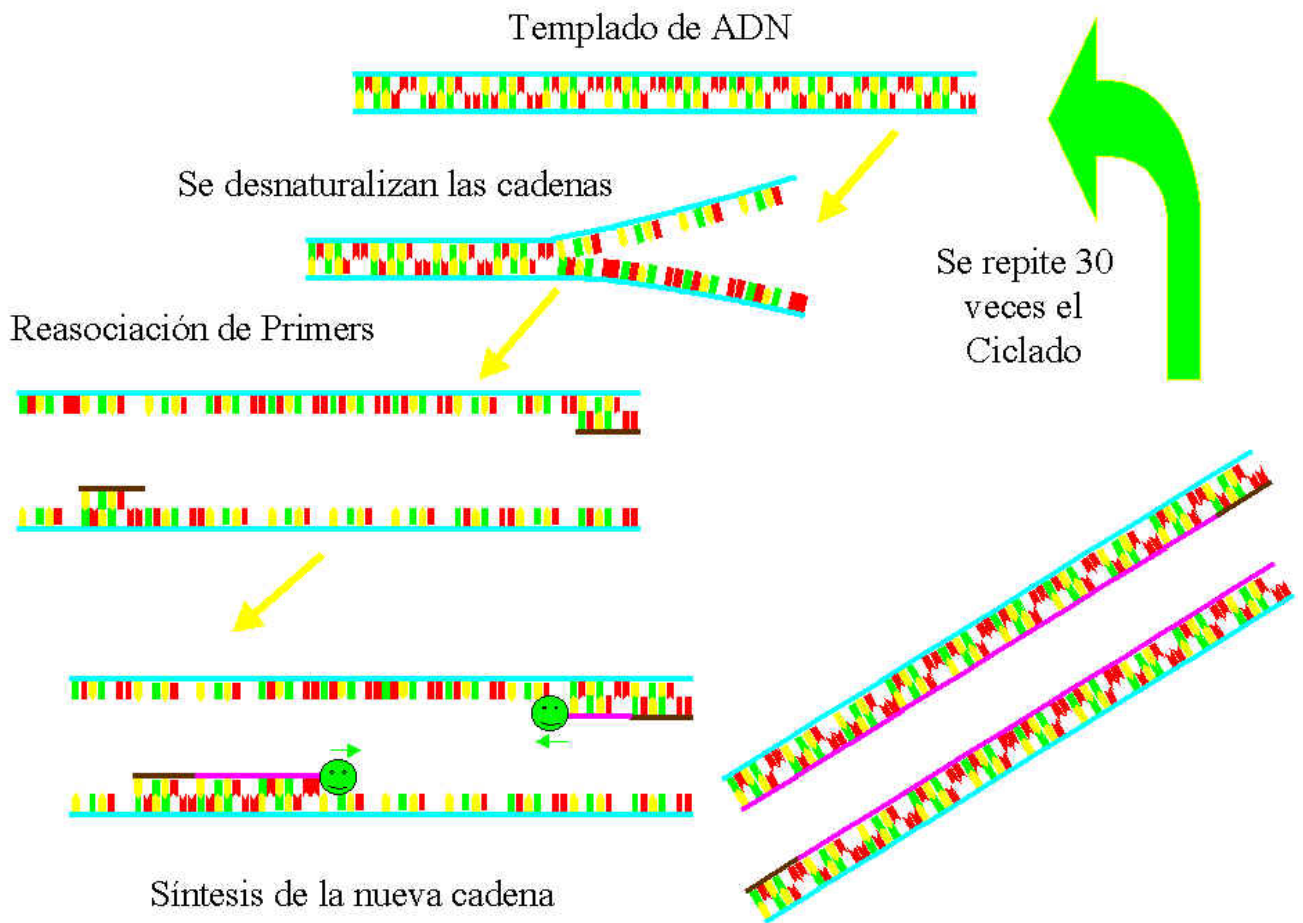


Figura 2

El uso de la enzima termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada Taq polimerasa para la "extensión" (Saiki et al, 1988), permitió la automatización del proceso mediante el empleo de cicladores térmicos electrónicos. El análisis genético podría efectuarse, entonces, en forma eficiente y fidedigna aún a partir de una simple célula (Jeffreys et al.1988, 1990).

Si bien se detectaron varios sistemas de minisatélites analizables por amplificación por PCR y análisis del tamaño de los productos (Amp-FLP o Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) como el Apo B (Boerwinkle et al, 1989), el

YNZ-22 (Wolff et al, 1988), y el COL2A1, tal vez el sistema más difundido lo constituye la región altamente polimórfica, de gran tamaño, constituida por 16 pares de bases repetidas de 18 a 42 veces, que se halla ubicada en el locus D1S80 y presenta 22 alelos detectados en la población general (Budowle et al, 1991; Sajantila et al, 1991; Baechtel et al, 1993; Kloosterman et al, 1993).

Evaluación de microsatélites:

Cada unidad de repetición de los microsatélites posee entre 2 y 5 nucleótidos, por lo cual se requiere la amplificación por PCR y evaluación posterior mediante geles de poliacrilamida (PAGE), similares a los empleados en secuenciación de ADN, que permiten discriminar diferencias de longitud de sólo un nucleótido.

Estas pequeñas secuencias presentan un número variable de repeticiones en tándem (**STRs** o "short tandem repeats"), desarrollándose los "primers" necesarios para su amplificación. Edwards et al (1991) describen 10 sistemas distintos, localizados en los cromosomas 1, 4, 6, 7, 11, 12 y X, que involucran secuencias repetidas de 3 ó 4 bases. Desde entonces, se incorporaron un número creciente de microsatélites (Kimpton et al, 1992; Polymeropoulos et al, 1992; Wiegand et al, 1993; Hammond et al, 1994). (Figura 2 bis).

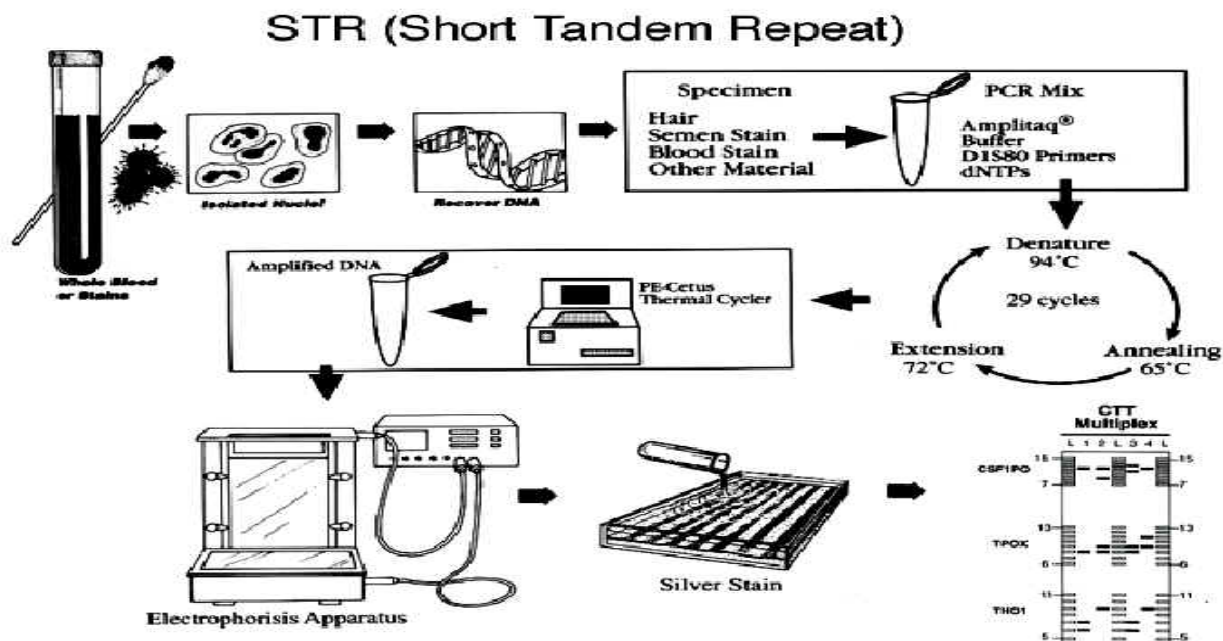


Figura 2 bis

Sistemas basados en diferencias en las secuencias nucleotídicas:

Variantes génicas nucleares

El primero y más difundido análisis con aplicación forense, es el que estudia una región localizada en el segundo exón del gen HLA-DQ-a del complejo mayor de histocompatibilidad (HMC). La corporación Cetus (USA) desarrolló un sistema que permite detectar, de esta región polimórfica, seis alelos diferentes, denominados 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3 y 4, por lo cual existen 21 genotipos distintos en la población general (Higuchi et al, 1988; Saiki et al, 1989; Comey et al, 1993).

Posteriormente, Cetus Corp. implementó un sistema denominado "Polymarker", que incluye, además del mencionado HLA-DQ-a otros cinco loci variables: LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, y Gc. Cada uno de ellos presenta dos o tres alelos diferentes en la población general (Budowle, 1994).

Variantes de ADN mitocondrial

Dentro de los sistemas cuya variación reside en la secuencia de nucleótidos, merece especial atención el estudio del ADN presente en las mitocondrias. En el año 1981, publican la secuencia completa del genoma **mitocondrial**, de aproximadamente 16,5 Kb, que presenta una región no codificante, denominada **Dloop**, donde se encuentra el origen de replicación, y que se caracteriza por presentar sitios con elevado índice de mutación.

Debido a que la información contenida en la secuencia mitocondrial es heredada a partir de la vía materna exclusivamente esto permite establecer vínculo de parentesco entre individuos maternalmente relacionados. El análisis de la secuencia permite diferenciar un individuo de otro de distinto linaje materno (Higuchi et al, 1988).

Esta característica, sumada a que cada célula contiene una gran cantidad de mitocondrias y por ello el genoma mitocondrial se halla mucho más representado que el contenido en el núcleo celular, hace que este sistema sea de suma utilidad, principalmente en los casos de material ampliamente degradado.

A partir del análisis de esta secuencia han sido caracterizados restos arqueológicos de varios miles de años de antigüedad, en los que fue factible obtener ADN mitocondrial relativamente bien conservado.

Revolución metodológica y perspectivas

A partir de 1990, los análisis mediante PCR fueron ganando espacio en los laboratorios forenses, debido a la relativa simplicidad de sus técnicas, menor costo e interpretación sencilla de los resultados, pero por sobre todo por requerir ínfimas cantidades de ADN: actualmente, es posible partir de tan sólo un nanogramo para analizar cada uno de los sistemas variables.

En algunas muestras tales como pequeñas manchas de sangre o semen, saliva, pelos o cadáveres antiguos, constituye la única posibilidad de lograr una caracterización genética (Hagelberg et al, 1991).

Las muestras de interés forense a ser amplificadas mediante PCR requirieron tratamientos especiales en cuanto a la extracción y purificación del ADN, que fue encarado por varios equipos de investigación, lográndose métodos eficientes a partir de ínfimas cantidades de material (unos 3 microlitros de sangre).

El desarrollo reciente de un método alternativo que utiliza bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) permite extraer ADN de huesos, dientes, piel y músculos humanos, con una notable reducción de contaminantes que dificultarían el análisis. Esta situación representa una gran ventaja respecto a los métodos tradicionales que emplean combinaciones de enzimas proteolíticas (proteínasa K, pronasa, etc.), y agentes caotrópicos (lauril sulfato de sodio, etc.).

Así, sintetizando la breve historia de la metodología empleada por la Biología Molecular Forense desde sus inicios, podemos observar cómo los análisis mediante sondas **multilocus** fueron reemplazados por las sondas de **locus único**, en caso de poder obtenerse ADN suficiente (alrededor de 200 nanogramos); y por sistemas de análisis basados en **PCR** si el ADN se encuentra en menor cantidad, ambos sistemas altamente reproducibles y de fácil interpretación (Hochmeister et al, 1991).

Otra modificación de las técnicas tradicionales consiste en el paulatino abandono de los métodos que emplean isótopos radiactivos, que son reemplazados con eficiencia similar por sistemas quimioluminiscentes (Sheffield et al, 1992).

El desarrollo, validación y aplicación de nuevos sistemas a nivel mundial se ve reflejado en su incorporación en nuestro medio, en el Laboratorio del Servicio de Huellas Digitales Genéticas.

El estudio del ADN hoy en día es un método muy utilizado para identificación de un cuerpo demostrando su identidad o bien el parentesco con familiares cercanos.

Se puede aplicar en las ciencias Forenses en diferentes casos, como:

- ANALISIS DE RESTOS OSEOS (CON AUSENCIA TOTAL DE TEJIDOS BLANDOS Y GRASOS)

Consiste en el análisis de estructuras óseas en estado árido o sea con ausencia total de tejidos blandos y grasos, las cuales pueden estar completas, incompletas o fragmentadas.

- ANÁLISIS DE RESTOS OSEOS (CON AUSENCIA PARCIAL DE TEJIDO BLANDOS).
- ANALISIS DE RESTOS DENTALES.
- ANÁLISIS DE RESTOS DE SEGMENTOS CORPORALES.

Estos análisis tienen gran importancia , son muchas las razones que hacen necesario establecer la identificación de un cadáver en una investigación criminal o muerte sospechosa, especialmente si, como sucede en muchos homicidios, el cuerpo es mutilado o escondido hasta que los cambios postmortem hacen imposible la identificación. Incluso en muertes no sospechosas, la descomposición aun en la estructura ósea puede ocasionar dificultades para el reconocimiento. Otra situación importante donde es vital la identificación del cadáver, es en desastres masivos como aterrizajes violentos, catástrofes naturales como terremotos, o incendios en edificios donde hay muchos individuos(Alcocer et al, 1993).

En ciertos casos y con la violencia que nos invade día a día no queda otra forma de indentificar si no por medio de restos que muchas veces en otros tiempos no eran más que simples manchas o artefactos inservibles.

6. MANEJO DE RESTOS BIOLÓGICOS EN LA IDENTIFICACIÓN POR ADN

Estos restos biológicos deben ser analizados en el laboratorio, pero para ello se debe tener en cuenta como manejarlos para que nos den información confiable.

Recuperación y limpieza del material

Lo esencial en la recuperación del material es minimizar la contaminación de las muestras con DNA extraño. Se debe poner especial cuidado con cada elemento que se encuentre en el lugar del hecho, y las personas que llegan primero al mismo, gotas de sudor, sangre, saliva, células epiteliales o cabellos de todos los que analizan el sitio o llegaron a él, deben tener total cuidado, porque pueden ser agentes contaminantes e invalidar las pruebas o los resultados devueltos por los laboratorios.

Por elemental que parezca, no debemos olvidar nunca que los laboratorios sólo estudian aquello que se remite, y que el análisis se inicia sobre el indicio en las condiciones en las que llega, no en las que se manda; de ahí la enorme importancia del indicio en el lugar de los hechos.

Durante la **recolección, conservación y envío**, debe evitarse la contaminación, ya que cualquier material orgánico procedente de los manipuladores o ruptura de la cadena de custodia puede imposibilitar el estudio.

Normas generales

En este sentido deben seguirse las siguientes normas generales:

1.- Procurar condiciones de máxima **esterilidad**, usando guantes de goma -si se entra en la escena del crimen- e instrumentos esterilizados o adecuadamente limpiados para la obtención de materiales (pinzas, tijeras etc.).

2.- Volver a limpiar o utilizar un **nuevo instrumento** para recoger un indicio diferente. Si se recoge con guantes, cambiar los mismos si se recoge un elemento diferente.

3.- Usar **diferentes recipientes** para cada indicio, aunque hayan sido recogidos en lugares muy próximos o estuviesen juntos.

4.- **Etiquetar perfectamente** cada uno de los recipientes haciendo referencia a:

- a. fecha y hora;
- b. identificación de la víctima;
- c. localización del indicio;
- d. tipo de indicio;
- e. número del mismo;
- f. nombre de la persona que lo recoge;
- g. referencia al caso judicial.

5.- **Enviar** lo más **rápidamente** posible al Juzgado o laboratorio, asegurando que si hay muestras con cadena de frío, esta se mantenga.

6.- Es fundamental y básico tomar **muestras testigo** de la víctima . De ser posible extrayéndole sangre.

7.- Tomar la **filiación de todas las personas** que han intervenido o colaborado en la recogida de las evidencias por si se produce algún problema de contaminación cruzada.

Normas generales en casos especiales

Estas normas generales se completarán con aquellas que son específicas a determinados vestigios orgánicos y a su forma de presentación.

Indicios líquidos. Se deben recoger con una jeringa estéril; la sangre debe mantenerse anticoagulada con EDTA, pero sirve con cualquier otro producto. También se pueden utilizar algodón, gasa, o hisopos estériles, para la recolección, dejándolos secar antes de almacenar.

Indicios húmedos. Se debe dejarlos secar a temperatura ambiente, sin aplicar ninguna fuente de calor. No deben guardarse en estado húmedo, ya que la humedad favorece el crecimiento de bacterias y hongos que puede afectar a la calidad del indicio (las enzimas restrictoras pueden degradar el DNA de los microorganismos).

Manchas secas. Las podemos encontrar sobre objetos transportables (cuchillo, bolígrafo, armas, elementos de limpieza, etc.) o sobre objetos no transportables (muebles, paredes, sanitarios, etc.). Dentro de los primeros debemos incluir aquellos que se pueden cortar (cortinas, alfombras, etc.). En el caso de que se puedan transportar enviaremos el objeto o el trozo cortado del mismo, excepto si se trata de alguna prenda de vestir que la remitiremos sin cortar. Cuando el objeto no es transportable (suelo, muebles,) procederemos a raspar la mancha con un instrumento estéril o lo mas limpio, depositando el raspado en un papel de similares caracteres, que se doblará e introducirá en un recipiente hermético limpio para mantener el indicio. En el caso de que se localicen pequeñas gotas, como consecuencia de salpicaduras, se debe raspar o tratar de recuperarlas aplicando sobre ellas una cinta adhesiva.

Restos sólidos. Con la misma precaución, procederemos a su recolección y almacenamiento. Cuando sean antiguos podremos tomarlos directamente usando guantes, pero si son recientes, frágiles o maleables debemos usar pinzas.

Pelos. Siempre se mantendrá el cuidado que las normas generales aconsejan, debiendo ser recogidos con pinzas. Debe evitarse un fallo muy frecuente al manejar pelos, ya que hay que almacenar cada pelo en un recipiente diferente,

pese a que aparezcan todos juntos e incluso parezcan, macroscópicamente, proceder de una misma persona.

Un tema aparte los representan los huesos en casos antiguos o identificación de restos con varios años o meses en cualquier medio, agua, tierra o sales de determinados terrenos.

Huesos. Deben ser manipulados con guantes de cirugía para evitar la contaminación con células epiteliales o sudor, como se dijo previamente. En lo posible trabajar con los huesos recientemente desenterrados, sin lavar. El lavado, el secado y posterior almacenamiento estando húmedo puede enmohecerlo y acelerar el proceso de degradación. El exceso de tierra o ceniza se elimina con escalpelo y el hueso se limpia en un chorro abrasivo de arena fresca de óxido de aluminio. Posteriormente, se elimina el polvo del hueso y el óxido de aluminio del hueso limpio utilizando una brocha suave (Hagelberg y Clegg, 1991: 45-46).

Una vez recogido el indicio debe conservarse en frío (+4°C) o congelarlo a la mínima temperatura posible. Se debe tener en cuenta que al conservar de esta manera, muy posiblemente se invalide las muestras para otros análisis diferentes a la identificación de DNA.

Química de indentificación

Tipificación del DNA

El método de tipificación del DNA desarrollado en 1983 por el profesor de la Universidad de Leicester, Alec J. Jeffreys, se basa en la metodología con la que se estudia patologías hereditarias, identificando genes causantes de enfermedades en familias portadoras de un trastorno congénito.

Comparativamente con la eficiencia de los marcadores de proteínas, en la identificación forense la tipificación del DNA posee dos ventajas:

1. puede utilizarse en el análisis de muestras pequeñas y antiguas;
2. su nivel de certeza de probabilidad es triple a cuádruple que la anterior.

Determinación

Para determinar si dos muestras de DNA poseen el mismo origen, se examinan las regiones variables de los pares de bases del DNA. Estas regiones pueden segmentarse mediante **enzimas de restricción** y se las denomina **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

Para la identificación del DNA se requiere que los RFLP sean altamente variables, es decir, polimórficos, con un gran número de variantes o locus en la población. Algunas regiones del DNA humano contienen secuencias centrales que se repiten variablemente en cada individuo y por tanto, cuando las enzimas de restricción cortan el DNA en millones de piezas, así también varía la longitud de los fragmentos. Mediante la introducción de sondas que se enlazan solamente con los fragmentos que portan la secuencia central se aíslan los fragmentos variables de los irrelevantes.

Los laboratorios forenses utilizan tres métodos distintos de tipificación del DNA:

1- Hibridación con sondas. Básicamente consiste en la identificación de una región determinada mediante el uso de una sonda, que es un fragmento monocatenario de DNA complementario a una secuencia de bases conocida. Esta sonda, marcada con un producto radiactivo o quimioluminescente, se pone en la solución con el DNA de la muestra y se visualiza después de una serie de procesos para separar los diferentes alelos que puedan existir con base en la longitud de los mismos.

2- Secuenciación. Las técnicas de este grupo van destinadas a revelar el orden de la secuencia de bases de una determinada región, normalmente delimitada previamente por PCR. Puede hacerse de forma manual o automática. En Medicina

Forense se aplica, fundamentalmente, para el análisis del DNA mitocondrial por sus especiales características.

3- Reacción en cadena de la polimeras (PCR). Esta técnica supuso una verdadera revolución y es la más extendida en la actualidad, por sí sola o como paso intermedio de la secuenciación. Inventada por Kary Mullis en 1987, le supuso el premio Nobel de Química. Es un instrumento de análisis óptimo, puesto que permite amplificar un pequeño número de moléculas intactas de DNA antiguo que está delimitada por una secuencia específica y complementaria a unas pequeñas sondas denominadas primers que actúan como iniciadores de la reacción de polimerización que lleva a cabo una enzima, habitualmente la Taq-polimerasa. Esta enzima va uniendo desoxinucleótidos, que se incluyen en la reacción, de forma complementaria a cada una de los fragmentos de las cadenas que se delimitan por los primers que se los toma como moldes. La repetición cíclica de este proceso permite la obtención de múltiples copias de dicha región en una cantidad suficiente para ser estudiada. Posteriormente, el DNA amplificado se puede visualizar mediante la separación de los alelos de diferente tamaño y tinción o estudiando las variaciones de su secuencia. De este modo es posible que cuando dispongamos de muy escasa cantidad de DNA en un indicio o esté parcialmente degradado, sea posible amplificarlo y obtener una cantidad suficiente para su análisis.

Para determinar si dos muestras de DNA poseen el mismo origen, se examinan las bandas identificadas por una sonda concreta en el autorradiógrafo y se comprueba su nivel de coincidencia. Los resultados se confrontan con la información existente sobre la caracterización genética de cada población para averiguar la frecuencia de aparición del tamaño de ese alelo en particular. Al considerar los alelos de varios sitios distintos disminuye la posibilidad de coincidencia de dos o más individuos. La posibilidad de que cualesquiera personas puedan tener la misma huella dactilar de DNA es de 1 entre 10.000-30.000 millones.

Todo lo anterior nos lleva a destacar dos grandes aspectos de la investigación del ADN en nuestra especialidad:

1.- Se trata de ADN no codificante, es decir, que la información obtenida tras su análisis no nos puede aportar nada sobre ninguna de las características fenotípicas del individuo. No obstante, conforme van avanzando las investigaciones sobre el Proyecto Genoma Humano se van descubriendo que parte del ADN no codificante está relacionado con alguna característica fenotípica, bien de tipo fisiológico o bien patológico (enfermedades). En cualquier caso en la mayoría de los casos la información es poco significativa desde el punto de vista práctico, tratándose más de un interés científico.

2.- Al igual que en tantos otros métodos de identificación médico-forense, es necesario llevar a cabo una comparación entre el perfil genético obtenido del indicio o muestra y el genotipo de un individuo o evidencia orgánica.

Problemas más comunes con los indicios

Criterios de autenticidad

El principal criterio que se debe tener en cuenta es el filogenético. Si la muestra se contaminó con material genético de flora y fauna animal se puede detectar su autenticidad mediante la inspección de las secuencias con especies afines relacionadas. En segundo lugar, el tamaño del producto amplificado puede servir como un criterio adicional de autenticidad. Recientemente se ha comprobado que no es posible amplificar fragmentos de DNA antiguo más allá de 150 bp (base-pair), aunque un hueso bien conservado puede ampliar hasta 500 bp. Estudios realizados en tejido momificado egipcio demuestran que el DNA antiguo se puede conservar en una forma clonable y que tanto el DNA nuclear como el mitocondrial pueden persistir durante varios milenios (Pavo et al, 1989).

Detección de fuentes de contaminación.

Con el fin de detectar cualquier fuente de contaminación se deben tomar algunas medidas de precaución (Pavo et al, 1989).

1. Realizar extractos de control en paralelo obtenidos de especímenes antiguos, para detectar contaminación en las soluciones y reactivos.
2. Preparar varios extractos independientes de cada individuo y comparar la identidad y la ausencia de ambigüedad en las secuencias.
3. En virtud de la fuerte correlación inversa entre la eficiencia de la amplificación y el tamaño del producto amplificado observado en el DNA antiguo pero no en el moderno, el tamaño del DNA amplificado puede servir como un criterio adicional de detección de contaminación. Secuencias superiores a 500 bp prueban invariablemente que la muestra se contaminó con DNA de especímenes modernos.

Errores producidos por cambios post mortem

Habitualmente no se espera que predominen los errores específicos producidos por cambios post mortem en una población amplificada de moléculas. Si llegan a predominar y a causar secuencias incorrectas, el patrón de sustitución puede afectarse en un sentido predecible. Las sustituciones pueden estar distribuidas aleatoriamente con relación a las posiciones de los codones, de hecho, no obstante, el índice de cambios silenciosos a cambios por remplazo al azar pueden ser de 2 a 8 (Paavo, 1989).

Secuencias en mosaico vía PCR saltarín

El PCR saltarín es una propiedad adicional que puede afectar la autenticidad de las secuencias amplificadas. Si las moléculas molde no abarcan el segmento total definido por el código existente en el extracto antiguo, la amplificación puede comenzar a partir de segmentos más cortos de DNA que son complementarios a

uno u otro de los códigos (primers). Esos fragmentos sirven como moldes en la primera extensión y los códigos parcialmente extendidos pueden ser extendidos en el siguiente ciclo después de hibridarse con otros fragmentos de la región que es amplificada. En el caso de genes cromosómicos de individuos heterocigóticos el PCR saltarín puede generar secuencias erróneas que resultan de la recombinación durante la amplificación (Paabo et al, 1989).

Presentación de las pruebas

Para que un test forense sea admitido como prueba, ha de cumplir tres condiciones (Neufeld y Colman, 1991):

1. Que la teoría científica en cuestión sea considerada válida por la comunidad científica;
2. La fiabilidad de la prueba debe ser reconocida;
3. Debe demostrarse que ésta se aplicó adecuadamente en el caso concreto.

En Estados Unidos se ha utilizado la prueba de DNA en más de 1.000 casos criminales, pero sólo en unas decenas de casos se le ha cuestionado en audiencias preprocesales. El poder de la identificación forense por DNA radica precisamente, no sólo en la capacidad de demostrar que dos muestras exhiben el mismo patrón, sino también para sugerir que el patrón es rarísimo. En este sentido, la validez de los datos y las hipótesis sobre las que se han basado los laboratorios forenses para estimar la rareza son objeto de debate entre la comunidad científica.

Los mayores problemas en la utilización de las pruebas de DNA radican:

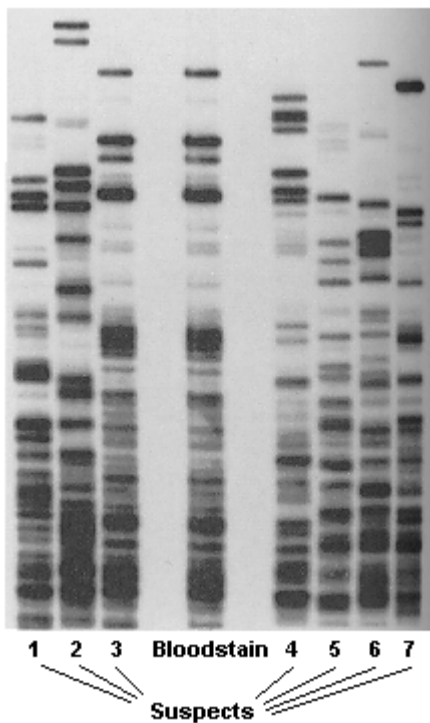
1. En los precios de las pruebas. Sus altos costos, la necesidad de recurrir a laboratorios competentes y en el exterior, los escasos recursos que en los tribunales se asigna a las pruebas periciales y la baja condición socioeconómica de los acusados en su mayoría dificultan su utilización.

2. Para que la prueba tenga una alta confiabilidad se requiere conocer el genoma de la población comparativa. Un estudio de esta magnitud cuesta varios millones de dólares.

3. La incorrecta manipulación de las muestras y las condiciones mismas de su degradación dificultan su utilización.

Presentación fotográfica

Como ejemplo de lo que finalmente sería la prueba presentada en base a las muestras analizadas en los laboratorios especializados, trataremos de mostrar la interpretación con una fotografía.



La misma muestra en el centro la principal muestra de sangre en el lugar primario del hecho. Se continuó con la tipificación de DNA con muestras sanguíneas de siete sospechosos. Comparativamente similar a al indicio primario es la muestra número 3.

7. FUTURAS TECNICAS

biochips

Las técnicas de análisis genético se encuentran hoy en día en continuo desarrollo y evolución. La necesidad de técnicas que permitan el aislamiento y análisis de los casi cien mil genes que componen el genoma humano justifica la existencia de líneas de investigación destinadas al descubrimiento de nuevos métodos que permitan monitorizar elevados volúmenes de información genética en paralelo y que reduzcan tanto el tiempo empleado como el coste por análisis.

Desde el análisis de los primeros polimorfismos de ADN con fines identificativos, la Genética Forense ha sufrido una gran evolución. Los expertos en la materia han sido testigos de cómo el descubrimiento de la PCR revolucionó las técnicas de identificación genética. Es probable que la próxima revolución la constituyan los llamados **biochips o microarrays**.

Los biochips surgen como consecuencia de una combinación entre técnicas microelectrónicas empleadas para la fabricación de microprocesadores informáticos y materiales biológicos. En general puede decirse que la principal característica de los chips es su capacidad para generar información en muy poco espacio, ya que posibilitan el procesamiento de multitud de ensayos simultáneamente. Esta característica es la que hace que los biochips sean probablemente la tecnología del futuro en el campo de las investigaciones biomédicas.

La fabricación de los biochips es similar a la de los chips informáticos: por medio de la técnica denominada fotolitografía se depositan circuitos microscópicos sobre láminas de silicio. En el caso concreto de los biochips, estas láminas son de vidrio y lo que se deposita en dichas láminas son cadenas de ADN. Las láminas de vidrio presentan una serie de ventajas como son:

Posibilidad de unir las cadenas de ADN a la superficie del cristal, convenientemente tratada, mediante enlaces covalente.

Su capacidad para aguantar altas temperaturas y lavados de elevada fuerza iónica.

Al ser un material no poroso el volumen de hibridación puede reducirse al mínimo.

Su baja fluorescencia evita ruidos de fondo.

Hay compañías comerciales que han desarrollado otras estrategias para la fabricación de biochips. No obstante, los más usados actualmente y con mayor número de aplicaciones son los basados en técnicas fotolitográficas.

Estos chips, como se dijo anteriormente, consisten en una pequeña lámina de vidrio que posee unos grupos reactivos, a los que posteriormente se unirán los nucleótidos, protegidos mediante una película realizada con un agente químico fotodegradable. Mediante una máscara que se sitúan sobre el chip, se logra enfocar un haz de luz hacia unas posiciones y regiones determinadas, degradando al agente químico protector en dichas zonas y dejándolo intacto en las zonas protegidas por la máscara. A continuación se añade al chip un medio que contiene uno de los cuatro nucleótidos que se unirá, mediante enlace covalente, al cristal con los grupos reactivos que hayan quedado desprotegidos. Cada grupo añadido lleva una molécula receptora fotodegradable.

Todo este proceso se va repitiendo con los diferentes nucleótidos y máscaras hasta generar unos oligonucleótidos con las secuencias que nos interesen.

Cada “casilla” del chip posee una cadena de un oligonucleótido de manera que solamente aquel fragmento de ADN que hibride perfectamente con ella permanecerá unido tras los diversos lavados.

Previamente a la hibridación, el ADN de la muestra a estudiar debe haber sido amplificado y marcado fluorescentemente en uno de sus extremos. Una vez marcado se incuba en el recipiente que contiene al chip tras lo cual se lava varias veces para eliminar los fragmentos que no hayan hibridado y se introduce el chip en un escáner en el que se detectan los patrones de hibridación. Esta detección se realiza en base a la fluorescencia emitida por los fluorocromos de la muestra cuando son excitados por luz y en aquellos pocillos en los que la unión haya sido completa la fluorescencia será mayor que los que contengan alguna base desapareada.

Un ordenador conectado al escáner es el que identifica las secuencias sonda por su posición en el chip.

Aplicaciones de los biochips A pesar de ser una tecnología muy reciente y que, por lo tanto, está aún en vías de experimentación, actualmente los biochips están siendo aplicados en:

Monitorización de expresión génica: permite determinar cual es el patrón de expresión génica y cuantificar el nivel de expresión de manera simultánea para un elevado número de genes. Esto permite realizar estudios comparativos de activación de determinados genes en tejidos sanos y enfermos y determinar así la función de los mismos.

Detección de mutaciones y polimorfismos: Permite el estudio de todos los posibles polimorfismos y la detección de mutaciones en genes complejos.

Diagnóstico clínico y detección de microorganismos: Posibilitan la identificación rápida empleando unos marcadores genéticos de los patógenos.

Screening y toxicología de fármacos: el empleo de los biochips permite el analizar los cambios de expresión génica que se dan durante la administración de

un fármaco de forma rápida, así como la localización de nuevas posibles dianas terapéuticas y los efectos toxicológicos asociados.

Seguimiento de terapia: los biochips permiten valorar rasgos genéticos que pueden tener incidencia en la respuesta a una terapia.

Medicina preventiva: El conocimiento y posible diagnóstico de ciertos caracteres genéticos asociados a determinadas patologías permite una prevención de las mismas antes de que aparezcan los síntomas

8. ESTUDIOS DE CASOS FORENSES

Caso de cremación

A continuación presentaremos un caso reportado por T. White (1991: 407-414) con el fin de ejemplificar los procedimientos anteriormente anotados. "Tenemos el testimonio pero no el cuerpo del delito". Katie Jones telefoneó a la policía de Cleveland, Ohio, para reportar la desaparición de su hermano mayor, Harry, en julio de 1984. Ella informó que su hermano había discutido con el señor Charles Cook, propietario del centro nocturno Chuckie's Corner. Jones y Cook tenían una enemistad de dos años, y la noche del sábado en que desapareció discutieron por una mujer. Cook insistió en que Jones abandonara el lugar y lo siguió posteriormente por la avenida Ashland. Los últimos testigos que vieron a Harry Jones afirmaron que su perseguidor había disparado varias veces sobre él. Charles Cook formó parte de los sospechosos pero negó contundentemente su vinculación, afirmando que su arma se había quedado esa noche en el Club. La investigación de las actividades de Cook continuó como principal sospechoso. Un testigo informó posteriormente que Cook se jactó de haberlo incinerado y que la policía no encontraría las huellas del crimen. Se descubriría además que Cook era supervisor asistente del Animal Resource Center en la Case Western Reserve University School of Medicine, y una de sus obligaciones era la de preparar los esqueletos de los animales investigados para incineración. Con estos indicios las autoridades recolectaron todos los vestigios del incinerador, que incluía huesos animales cremados, una pieza derretida de plomo con una masa y tamaño de aproximadamente una bala de calibre 38.

La unidad de Homicidios de Cleveland organizó una completa investigación del crimen, solicitando la asesoría de odontólogos forenses, radiólogos y antropólogos forenses. Se analizó el contenido de 25 gavetas metálicas que contenían 135 kilogramos de restos óseos. Se seleccionaron los fragmentos de huesos humanos, gracias a la colaboración del antropólogo físico Dr. C. Owen Lovejoy de la Kent

State University. El inventario óseo demostró que los restos estaban muy fragmentados, quebradizos, de color blanco-grisáceo, reducidos y exfoliados completamente como consecuencia de las altas temperaturas alcanzadas por el incinerador (cerca de 1.000 grados centígrados). Una vez separados los 163 fragmentos óseos humanos se procedió a establecer el número mínimo de individuos representados en la muestra. Las partes mejor conservadas fueron las porciones proximales de los fémures, los acetábulos, las cabezas humerales, fragmentos craneales, mandibulares, vertebrales y de otros huesos.

Se logró diagnosticar la presencia de un sólo individuo. A juzgar por los fragmentos de las cabezas femorales y humerales. Por la región supraorbital, la protuberancia occipital externa del occipital, se concluyó que era un individuo de sexo masculino. Una porción de la cara sinfisial del pubis y las dos superficies articulares del ilion sugerían que era un individuo de aproximadamente 36 +/- 5 años de edad. Aunque Harry Jones tenía 37 años de edad al desaparecer, las conclusiones de C. O. Lovejoy fueron sugestivas pero no conclusivas. Gracias a que se tenía un excelente registro radiográfico en la región mandibular de Harry, se cotejaron las radiografías obtenidas del fragmento mandibular con las del occiso que se habían conservado en St. Luke's Hospital, University Hospital, y el Cleveland Metropolitan General Hospital. La radiolucencia alveolar por pérdida de dientes, la presencia de una zona de densidad calcificada de 5 mm de diámetro en el cuerpo mandibular y otras áreas de tejido trabecular a lo largo del canal mandibular en el borde inferior, coincidían con las radiografías obtenidas de Jones en 1977 y 1981 con los del cuerpo calcinado descubierto en 1984. Las conclusiones del cotejo radiográfico y las del peritaje de antropología forense en donde se evidenciaba la pertenencia de los restos óseos encontrados en el Animal Resource Department of de la Case Western Reserve University School of Medicine al señor Harry Jones, fueron remitidas a la corte de Cleveland. Las grabaciones fílmicas de los circuitos cerrados de televisión señalaban que Charles Cook entró a la edificación la noche del sábado del crimen a las 3:10 a.m.; a las

3:15 a.m. llegó al incinerador. No obstante se había reportado en el libro de registros como si hubiera trabajado a las 6:00 a.m. Ante el peso de las evidencias Charles Cook confesó el crimen y fue condenado a 15 años de prisión.

Este caso demuestra que entre mayor sea la cantidad de evidencias antemortem (historias clínicas, radiografías, fotografías, descripciones somáticas) y los datos asociados al esqueleto, objeto de análisis, el proceso de identificación se aproxima al 100% de probabilidades de acierto. Si además existen prendas, objetos de uso personal y el esqueleto completo, el peritaje forense aportará pruebas irrefutables que conducirán a un fallo positivo en los organismos judiciales. Si los huesos son escasos, fragmentados y poco informativos, el grado de acierto disminuirá proporcionalmente al número de evidencias recolectadas y a la experiencia del investigador forense. Así, los huesos hablan y cuentan su historia siempre y cuando existan procedimientos adecuados para hacerlos hablar.

2. Utilización del DNA en un asunto forense

Recientemente las pruebas citogenéticas han revolucionado la paleontología tradicional al posibilitar la extracción de DNA de tejidos antiguos, incluyendo especímenes de varios centenares de años (Hagelberg & Clegg, 1991). Pääbo y colaboradores han recuperado secuencias de DNA nuclear de la piel de una antigua momia egipcia y DNA mitocondrial de un cerebro humano de 7 000 años de antigüedad, analizados mediante el PCR (polymerase chain reaction).

Gracias a la estabilidad del DNA mitocondrial (heredado solamente de la madre, tiene una tasa de mutación estable) se han podido reconstruir líneas maternas hasta llegar a la llamada Eva mitocondrial (Newsweek, January 1988).

Uno de los casos forenses más interesantes se presentó en el Reino Unido a finales de la década del 80. En 1981 la quinceañera Karen Price fue asesinada

violentamente y enterrada en el patio de una casa de Cardiff. Ocho años más tarde su cuerpo fue descubierto dando inicio a una exhaustiva investigación en la que tomaron parte varios especialistas de distintas disciplinas. El anatomista dental David Whittaker diagnosticó una edad entre 14-17 años, aunque más cercana a los 15 y medio años por el estado de erupción dental. El antropólogo Chris Stringer, del Museo de Historia Natural de Londres estimó que pertenecía al sexo femenino, de patrón racial caucasoide-mediterráneo (Karen era de ascendencia galesa, grecochipriota, española y estadounidense), deducción obtenida al comparar cerca de 2 500 cráneos de la colección del Museo. El entomólogo forense Zakaria Erzinclioglu de la Universidad de Cambridge analizó los insectos ubicados en el cuerpo estipulando un tiempo de inhumación de por lo menos cinco años. Anteriormente el ilustrador médico Richard Neave de la Universidad de Manchester había recibido el cráneo de la víctima, del cual obtuvo una réplica de yeso. A partir de éste elaboró una reconstrucción facial que la policía utilizó para fotografiar y publicar la información de la víctima, a través de volantes. Dos trabajadores sociales reconocieron la foto. Posteriormente Peter Vanezis, jefe forense del Cahring Cross and Westminster Medical School de Londres practicó la superposición cráneo-foto en imágenes de video, evidenciando un alto parecido. También se obtuvo la carta dental cuya comparación con la del cuerpo confirmó su identidad. Alan Charlton, presunto asesino fue inmediatamente detenido.

El paso final y más espectacular en este proceso de identificación del cuerpo, se manifestó en el estudio genético realizado por Erika Hagelberg, bioquímica de la Universidad de Oxford, y el profesor de la Universidad de Leicester, Alec Jeffreys, quienes extrajeron DNA de un diente del cuerpo de la occisa y lo compararon con el obtenido de los padres de Karen. El profesor Jeffreys concluyó que existía un 99,99% de probabilidad de que el cuerpo correspondiera a Karen Price.

Aquí por primera vez se utilizaban tres pruebas citogenéticas:

1. La prueba del PCR (Polymerase Chain Reaction).

2. El uso de segmentos cortos de DNA para obtener la huella genética.
3. La extracción y análisis de DNA antiguo, obtenido de restos óseos.

De esta manera, Alan Charlton fue condenado a cadena perpetua por el asesinato de Karen Price (The Independent on Sunday, 7th april 1991:50; Selecciones de Rider Digest, diciembre de 1992).

OBJETIVOS.

- 1.- Evaluar las técnicas de análisis del ADN en la identificación de Restos Humanos
- 2.- Analizar las aplicaciones de la genética a la identificación, sus limitaciones y el manejo de los indicios biológicos para su análisis en el laboratorio.

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Son muchas las razones que hacen necesario establecer la identificación de un cadáver o bien de los restos biológicos que se puedan encontrar.

Debido a que con frecuencia se encuentra con problemas para la identificación de personas muertas, ya sea porque no se tiene un solo dato de la persona o por que los cuerpos se encuentran irreconocibles o bien tampoco en condiciones de ser presentados a sus familiares para su identificación visual (Knight, 1994); se tiene que hacer uso de técnicas cada vez más especializadas, como es la llamada huella genética.

En algunas ocasiones se tiene que realizar la identificación de personas por medio de pequeños restos biológicos, unicos y fragiles, de los cuales se puede obtener información genética, para ello se debe realizar cuidadosos procesos de recogida, almacenamiento y envio de estos restos biológicos para que se esclarezca la individualización de estas personas, al mismo tiempo que las técnicas de análisis han evolucionado.

CONCLUSION

Fundamentalmente la tipificación por DNA no está fuera de alcance ni es una cosa de otro mundo, con el avance tecnológico, cada vez se utilizará más. Por otro lado, se debe tener en cuenta el exquisito cuidado a la hora de la obtención de las pruebas. También se debe considerar que no siempre es aceptado como prueba irrefutable. Pero un buen examen basándose en lo clásico, con la ayuda de todas las ramas de la Medicina Forense, y sin necesidad de darle más valor del que realmente tiene a esta prueba, y a los avances que seguramente vendrán, se puede llegar a una identificación de los causantes, en el caso de crímenes, a la identificación de víctimas casi con un 99 % de positividad.

Tomando a BERTILLON, se puede afirmar que *"sólo se recoge lo que se ve, y sólo se ve lo que se tiene en la mente"*, lo cual exige una formación y conocimiento adecuado del trabajo por realizar.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez García, A; Muñoz, I; Pestoni, C; Lareu, M; Rodríguez Calvo, M; Barros, F and Carracedo, A (1996) *Adv. in For. Haem.* 6: 255-257.

Aznar, B. y Maestre, T. (1945). Identificación de restos cadavéricos óseos. *Investigación* 211, 79-81.

Baechtel, F. S.; Smerick, J. B.; Presley, K. W. and Budowle, B. (1993). Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus D1S80. *J. For. Sci.* 38: 1176-1182.

Bever, R and Creacy, S (1995). *Proceedings from the fifth International Symposium on Human Identification.* Promega Corp, 61-68.

Boerwinkle, E.; Xiong, W.; Fourest, E. and Chan, L. (1989). Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the PCR: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 212-216.

Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A. M.; Eisemberg, A. J. and Allen, R. C. (1991). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 137-144.

Budowle, B.; Lindsey, J.A.; DeCou, J.A.; Koons, B.W.; Giusti, A.M. and Comey, C.T. (1994) Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc (PM loci), and the DQa using a multiplex amplification and typing procedure. *Journal of Forensic Sci.* (in press).

Clement, J.C. and Sri-Skanda, S. (1985). The contribution of dental histology to Forensic Medicine. *Acta Med. Leg. Soc.* 35 (1): 300-309.

Comey, C. and Budowle, B. (1991). Validation studies on the analysis of the HLA DQalpha locus using the PCR. *J. of For. Sci.* 36: 1633-1648.

Comey, C.; Budowle, B.; Adams, D.; Baumstark, A.; Lindsey, J. and Presley, L. (1993) PCR amplification and typing of the HLA DQalpha gene in forensic samples. *J. For. Sci.* 38: 239-249.

Corach, D. (1991) A reliable, rapid and simple method for DNA extraction from frozen sperm cells. *Fingerprint News* 3: 13.

Drago, G; Thomson, J and Lincoln, P (1994) *Adv. in For. Haem.* 5: 271-274.

Edwards, A.; Civitello, A.; Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746-756.

Gill, P. and Werret, D. J. (1987). Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Science International* 35: 145-148.

Gill, P., Ivanov, P., Kimpton, C., Piercy, R.; Benson, N.; Tully, G and Evett, I (1994). *Nat. Genet.* 6: 130-135.

Giusti, A., Baird, M., Pasquale, S., Balazs, I. and Glassberg, J. (1986). Application of DNA polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. *J. For. Sci.* 31: 409-417.

Hagelberg, E.; Gray, I. and Jeffreys, A. (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429.

Hammond, H; Jin, L; Zhong, Y; Caskey, C and Chakraborty R. (1994) *Am. J. Hum. Genet* 55: 175-189.

Hershey, A and Chase, M (1952) *J. Gen. Physiol.* 36: 39-56.

Higuchi, R.; von Beroldingen, C. H.; Sensabaugh, G. F. and Erlich, H. A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543-546.

Hochmeister, M. N.; Budowle, B.; Borer, U.; Eggman, U.; Comey, C. and Dirnhofer, R. (1991). Typing of DNA extracted from compact bone from human remains. *Journal of Forensic Science* 36: 1649-1661.

Holland, M; Fisher, D; Lee, D; Bryson, C and Weedn, V (1993) *DNA Fingerprinting: State of the Science* Birkhauser Verlag Basel/Switzerland 267-274.

Jeffreys, A. J.; Wilson, V and Thein, S. (1985a). *Nature* 314: 67-73.

Jeffreys, A. J.; Brookfield, J. F. Y. and Semeonoff, R. (1985b). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818-819.

Jeffreys, A. J.; Neuman, R. and Wilson, V. (1990). Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 60: 473-485.

Jung, J.; Comey, C.; Baer, D. B. and Budowle, B. (1991). Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQalpha gene. *Int. J. of Legal Medicine* 104: 145-148.

Kayser, M et al (1997) Evaluation of Y chromosome STRs: a multicenter study. *Int. J. of Legal Medicine* (in press).

Kersta, L.G. (1962). Voice identification. *Nature* 196: 1253-1257.

Keyser, C; Montagnon, D; Ludes, B; Crubezy, E; Cardon, D; Walton Rogers, P; Wouters, J and Mangin, P (1996)) *Adv. in For. Haem.* 6: 292-294.

Kimpton, C.; Walton, A.; Gill, P. (1992). A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet* 1: 28.

Laiho, K. and Pentilla, A. (1981). Autolytic changes in blood cells and other tissue cells of human cadavers. *For. Sci. Int.* 17: 109-120.

Lander, E. S. (1989) DNA fingerprinting on trial. *Nature* 339: 501-505.

Nurnberg, P.; Roewer, L.; Neitzel, H.; Sperling, K.; Poperl, A.; Hundrieser, J.; Poche, H.; Epplen, C.; Zischler, H. and Epplen, J. T. (1989). DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)₅/(GTG)₅: somatic stability and germline mutations. *Hum. Genet.* 84: 75-78.

Paabo, S (1990) PCR protocols: 159-169.

Penacino, G. y Corach, D. (1993) "Identificación Post-Mortem de Individuos Mediante Tipificación de ADN: Estrategias Generales de Aplicación Forense". XXIX Reunión Anual de SAIB. Villa Carlos Paz, Córdoba, 17-21 de noviembre de 1993.

Penacino, G., Sala, A. and Corach, D. (1994). "Post Mortem Molecular Identification. Biological kinship Established by DNA Analysis". *ADVANCES IN FORENSIC HAEMOGENETICS* 5. Springer- Verlag. p. 289-291.

Peneau, A; Rolland, J; Tesson, C; MOisan J and Pascal, O (1994). *Acta Medicinæ Legalis XLIV*: 78-80.

Polymeropoulos, M.; Xiao, H.; Merrill, C (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human myelin basic protein gene (MBP) *Hum Mol Genet* 1: 658.

Prinz, M and Schmitt, C (1995) *Adv. in For. Haem.* 5: 375-378.

Rivas, E; Vicente, C; Gamella, J; González, J and Andradas, J (1996) Adv. in For. Haem. 6: 313-315.

Roewer, L; Arnemann, J; Spurr, N; Grzeschilk, K and Epplen, J (1992) Hum. Genet. 89: 389-394.

Roewer, L; Kayser, M; Dieltis, P; Nagy, M; Bakker, E and De Knijff, P (1996) Hum. Mol. Genet. 5: 1029-1033.

Saiki, R; Bugawan, T; Horn, G; Mullis, K and Erlich, H (1986) Nature 324: 163-166.

Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Saiki, R. K.; Walsh, P. S.; Levenson, C. H. and Erlich, H. A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 6230-6234.

Sajantila, A.; Ström, M.; Budowle, B.; Karhunen, P. J. and Peltonen, L. (1991). The PCR and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQalpha loci to the identification of fire victims. For. Sci. Int. 51: 23-24.

Sala, A., Penacino, G., Carnese, R. y Corach, D. (1994). "Estudio de las Frecuencias Alélicas de Sistemas Hipervariables en Poblaciones Argentinas". II Congreso Latinoamericano de Genética, Puerto Vallarta, México.

Sala, A.; Penacino, G. and Corach, D. (1997b) Comparison of genetic attribute among Argentina caucasoid and aboriginal populations by means of eight STRs reveals significant differences. Human Biology (enviado).

Sanchez-Hanke, M; Püschel, K; Agustin, C; Wiegand, P and Brinkmann, B (1996) Adv. in For. Haem. 6: 316-318.

Sanz, P; Prieto, V and Andres, M (1996) Adv. in For. Haem. 6: 319-321.

Schneider, P.M.; Fimmers, R. and Woodroffe, S. (1991). Report of a European collaboration exercise comparing DNA typing results using a single locus VNTR probe. For. Sci. Int. 49: 1-15.

Sheffield, J.; Benjamin, W. and McDaniel, L. (1992) Detection of DNA in Southern blots by chemiluminescence is a sensitive and rapid technique. Biotechniques 12: 836-838.

Smith, J. C.; Anwar, R.; Riley, J.; Jenner, D.; Markham, A. F. and Jeffreys, A. J. (1990). Highly polymorphic minisatellite sequences: allele frequencies and mutation rates for five locus specific probes in a caucasian population. *J. For. Sci. Soc.* 30: 19-32.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.

Vassart, G.; Georges, M.; Monsieur, R.; Brocas, H. and Lequarre, S. (1987). A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235: 683-684.

Watson, J and Crick, F (1953) *Nature* 171: 737-738.

Wolff, R.K.; Nakamura, Y.; White, R. (1988) Molecular characterization of a spontaneously generated new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA sequence. *Genomics* 3: 347-351.

Wong, Z.; Wilson, V.; Patel, I.; Povey, S. and Jeffreys, A. J. (1987). Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.* 51: 269-288.

Wyman, A. R.; White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6754-6758.

Yoshii, T; Akiyama, K; Tamura, K and Ishiyama, I (1994) *Adv. in For. Haem.* 5: 393-396.