



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES “ZARAGOZA”
CARRERA QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**Ácido desoxirribonucleico mitocondrial y su aplicación
forense**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

JUANA ROSAS VELÁZQUEZ

ASESORA: LEONOR AGUILAR SANTELISES

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE DEL 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 por su apoyo y comprensión, porque con su ejemplo me enseñaron a ser responsable.

Le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar y poder ser parte de la máxima casa de estudios, es un orgullo pertenecer a esta Institución.

A todos mis profesores maestros y personal por su dedicación. En especial al maestro Mauro y mi amiga Blanquita por transmitir la información y sus conocimientos de manera incondicional.

A mis sinodales Leonor Aguilar, Pilar Cedillo, Cesar Octavio Jiménez, Rosalba Cervantes y Liliana López.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida e iluminar siempre mi camino.

A mis padres Agustín y Catalina por su ejemplo. A mi ma`Cata porque con su carácter me ha enseñado a ser mejor persona cada día.

A mi querido Carlos por ser antes de un gran esposo mi mejor amigo, por confiar en mí y ayudarme a conseguir mis metas, por tu gran paciencia, por estar siempre a mi lado y hacerme siempre la vida tan feliz TE AMO.

A mis pequeños traviesos: Tanilea, Juanin, Karlita y Alex por ser el motor de mi vida.

A mis queridos hermanos: Lety, Bertha y Blanca porque siempre me han fortalecido. En especial a Chela, Monin y Flor por ser personas tan nobles e incondicionales y apoyarme siempre.

A mis abuelitos en el cielo y a mi querida abuelita Petra.

ESTO ES PARA USTEDES

INDICE

	Página
INTRODUCCIÒN	6
OBJETIVOS	8
CAPITULO 1: FUNDAMENTACION DEL TEMA	9
1.1 Antecedentes históricos	10
1.2 ADN mitocondrial	11
1.3 Eva mitocondrial (ancestro femenino de la población humana actual)	13
1.4 La población humana	14
CAPITULO 2: MARCO TÈORICO	16
2.1 Criminalística	17
2.1.1 Material sensible significativo	17
2.1.2 Cadena de Custodia	18
2.1.3 Clasificación de indicios	18
2.1.4 Recuperación y limpieza de muestras	19
2.2 Célula	22
2.2.1 Estructura de la célula animal	22
2.3 ADN (Ácido desoxirribonucleico)	24
2.3.1 La huella digital del ADN	26
2.4 Degradación del ADN después de la muerte celular	27
2.4.1 Hidrólisis	27
2.4.2 Oxidación	28
2.4.3 Factores que influyen en la conservación del ADN antiguo	29
2.5 Aplicaciones forenses del ADN	30
2.6 Marcadores	31
2.6.1 Polimorfismos	33
2.6.2 Identificación personal	34
2.7 ADN en muestras antiguas (aADN)	35
2.7.1 Historia del aADN	35
	3

2.8	Estructura del Genoma Humano	36
2.8.1	ADN nuclear	37
2.9	Estructura y organización del ADNmt	38
2.9.1	ADNmt como linaje materno	40
2.9.2	Organización del ADNmt	41
2.9.2.1	Región Codificante	42
2.9.2.2	Región No Codificante	43
2.10	Cromosoma Y	44
2.11	Genoma Nuclear vs Mitocondrial	45
CAPITULO 3. MÉTODOS DE ESTUDIO		46
3.1	Reacción en cadena de la Polimerasa (RCP)	47
3.1.2	Lesiones que bloquean la Polimerasa	49
3.1.3	PCR En tiempo real	49
3.2	Tipos de Polimorfismos	50
3.2.1	Polimorfismos de Repetición	50
3.2.1.1.	ADN microsatélites (STR)	51
3.2.1.2	ADN minisatélites (FRLP)	52
3.2.2	Polimorfismos de Secuencia (SNP)	54
3.3	Amelogenina	55
3.4	Microchips	55
3.5	Práctica Forense	57
3.5.1	Extracción del ADN	57
3.5.2	Cuantificación	58
3.5.3	Amplificación	59
3.5.4	Secuenciación	60
3.5.4.1	Minisequenciación fluorescente en fase sólida	60
3.6	Heteroplasmia	61
3.7.	Contaminación	61
3.8	Validación de STR en el análisis de ADNmt	64
3.9	Presentación de las pruebas	65

3.10 La base de datos	68
ANALISIS DE RESULTADOS	71
CONCLUSIONES	73
ANEXOS	74
BIBLIOGRAFIA	82

INTRODUCCIÓN

En las noticias es común ver que la violencia y el índice de delincuencia aumentando considerablemente; todos en la actualidad somos susceptibles de sufrir algún tipo de agresión a nuestra integridad moral y en algunos casos física (robos, extorsiones, secuestros reales y virtuales, asaltos, crímenes etc.); por lo que en algunas ocasiones se requiere hacer uso de los avances científicos para la identificación de alguna persona.

En este trabajo se analizarán en cada uno de los siguientes capítulos los aspectos más notables en el avance del Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) y su aplicación, dentro del ámbito forense, la utilización de cada uno de los métodos de elección según sea el caso en el que se va a aplicar.

Hace apenas dos décadas a finales de los ochentas el laboratorio del FBI (Federal Bureau of Investigation u Oficina Federal de Investigación de los Estados Unidos) comenzó a implementar técnicas enfocadas al estudio del ADNmt para la identificación humana; esto surgió como una necesidad para resolver el caso del abuso sexual de una menor. Desde entonces la tecnología de ADN ha avanzado a pasos agigantados.

Aún cuando se le considera una metodología joven, ha tomado gran importancia en la actualidad, porque pese a ser una técnica costosa y que requiere de muchas horas de proceso para su análisis, esta ha sido decisiva y contundente ante la corte para solucionar casos jurídicos civiles y/o penales; como casos de paternidad biológica, desaparecidos, violaciones, asesinatos etc. Por lo tanto la identificación de perfiles genéticos por medio de esta prueba empieza a tomar mayor auge.

La importancia de desarrollar técnicas confiables y rápidas en una investigación legal, hace necesaria la búsqueda constante en la modernización de técnicas y mejorar los métodos existentes; puesto que en muchos de los casos esto es fundamental para incluir o excluir la participación de un individuo en un hecho delictivo.

Existen métodos y procedimientos para el análisis de las muestras y nos den confiabilidad en los resultados, pero la realidad es que en el área forense las condiciones en que se encuentran las muestras no siempre es la ideal. Llegando incluso a situaciones críticas en las que el ADN nuclear se encuentra totalmente degradado; es aquí donde la función del ADNmt está indicada, porque debido a que se encuentran mayor cantidad de mitocondrias por célula (de ADN nuclear solo uno por célula y las mitocondrias pueden ser de cientos a miles por célula) es posible encontrar algunas plantillas de ADNmt para determinar un perfil genético; comúnmente estas se encuentran mejor conservadas en muestras como dientes huesos y en algunas ocasiones en pelos.

La identificación de perfiles genéticos es una técnica que aparece a mediados de los ochentas y se considera como una metodología relativamente joven. Sin embargo, como en muchas otras áreas de la ciencia, ésta en particular ha tenido un enorme desarrollo en muy corto tiempo, desde la aplicación de la “huella genética” hasta la implementación de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y el análisis de los STRs (Short Tandem Repeat o repeticiones cortas en Tandem) han aparecido en la literatura científica una infinidad de investigaciones, desarrollos de tecnologías y procedimientos pre-analíticos y analíticos que persiguen abatir tiempos, y costos en el material, reactivos y equipos que se utilizan en los laboratorios. (1)

Sin embargo., a pesar de la gran cantidad de información existente sobre el tema, los errores en la toma de muestra, el embalaje y el envío al laboratorio, hacen necesario y urgente la documentación de la información básica con el fin de difundirla entre las personas involucradas en cada una de las etapas del análisis del ADN, incluyendo el lugar de los hechos. (1).

Actualmente el análisis de ADNmt de objetos hallados en la escena del crimen tiende a ser más común. El ADNmt se ha convertido en la vía alternativa para muestras muy degradadas y ambientalmente expuestas o para cantidades muy pequeñas de evidencia biológica. Debido a la abundancia de mitocondrias en los tejidos y en muestras donde el ADN nuclear no se puede realizar, tal como las hebras de pelo, estos pueden contener suficiente cantidad de ADNmt para la identificación forense.

OBJETIVOS

- **Realizar investigación bibliográfica para conocer las distintas técnicas empleadas en el análisis del ADNmt.**

- **Destacar la importancia de cuando el análisis de ADN nuclear resulta inútil y surge la alternativa de realizar el ADNmt en casos forenses.**

- **Señalar el alcance que ha tomado el análisis de ADNmt a partir de muestras mínimas o muy degradadas.**

- **Establecer el papel que juega el análisis del ADNmt en casos de desastres masivos (atentados terroristas, terremotos, accidentes, etc.)**

CAPITULO 1

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

1.1 Antecedentes históricos

En 1960 Bobo Guthrie, de la Universidad del estado de New York en Búfalo desarrolló una clase de diagnóstico con implicaciones diferentes; que permite identificar una enfermedad hereditaria del metabolismo. El diagnóstico genético basado en el análisis directo del ADN, que no sólo sería útil en lo que respecta a enfermedades hereditarias o a cáncer sino también en el ámbito forense. Ya que es posible determinar, con absoluta precisión, de quien provino una muestra de ADN contenida en apenas unas gotas de sangre, de semen o, en teoría ¡incluso de un cabello! (1)

Como se sabe el material genético esta contenido en el ADN, dentro de él esta codificada la información en 46 cromosomas (23 pares homólogos) en el núcleo celular y un pequeño cromosoma en el ADN mitocondrial. En la fecundación, el ovocito y el espermatozoide, que contienen sólo 23 cromosomas cada uno, se combinan para dar una célula con 23 pares de cromosomas diferentes (46 cromosomas). (2).

La evolución de la genética forense tiene por objetivo el análisis de la variación en la genética humana sus inicios tiene poco mas de un siglo con el descubrimiento de Karl Landsteiner de la sangre humana, en los polimorfismos de los grupos del sistema sanguíneo ABO y esta variación se observó que era aplicable para solucionar crímenes. Es significativo que inclusive un sistema genético simple como el ABO se pueda utilizar para demostrar que una muestra no proviene de una persona específica (probar una exclusión), sin embargo probar que una muestra proviene de una persona específica es más difícil y depende del grado de variación de los marcadores. (3)

Hacia finales de la década de los ochentas el laboratorio del FBI en los Estados Unidos de Norteamérica comenzó a implementar estudios viables enfocados en el análisis del ADN mitocondrial para la identificación humana. La investigación del laboratorio comenzó por un protocolo para usar el ADNmt que se ordenó en estudios de antecedentes forenses en 1992. (4)

Después de que la técnica de secuencia fuera validada, los exámenes en muestras de evidencia comenzaron en Junio de 1996; la secuencia de ADNmt es de uso frecuente en casos donde la evidencia biológica se encuentra degradada o en pequeña cantidad; los casos en los que los pelos, los huesos, o los dientes son la única evidencia recuperada en la escena del crimen. (5)

En los casos de los desaparecidos puede ser de utilidad la prueba del ADNmt cuando los restos encontrados se recuperan y se comparan con las muestras de los parientes maternos u objetos personales a falta de individuos. También, los pelos recuperados en la escena del crimen se pueden utilizar a menudo para incluir o para excluir a individuos usando la prueba del ADNmt. (4)

1.2 ADN Mitocondrial (ADNmt)

El ADNmt, sólo es heredado por la madre de forma que **todos los hijos de una misma madre tienen la misma información genética en el ADNmt**. La mitocondria tuvo en el pasado un interés restringido a los estudiosos de la citología, la bioquímica metabólica y la bioenergética. Sin embargo, desde hace pocos años la mitocondria humana se encuentra en un primer plano de la actualidad de las ciencias biomédicas. Este cambio radical se fundamenta en varios hechos:

1) El conocimiento de un numeroso grupo de enfermedades genéticas metabólicas, entre las cuales figuran más de medio centenar debidas a mutaciones puntuales consistentes en la sustitución de unas bases por otras, afectando a distintos genes del genoma mitocondrial. A esto hay que añadir los varios cientos de mutaciones no puntuales como son reordenaciones genéticas del tipo de las deleciones o las inserciones de fragmentos de ADN de distinto tamaño. Este aspecto de la mitocondria humana ha llamado la atención de los científicos interesados en la terapia génica.

2) La utilidad del ADNmt como un *marcador de gran confiabilidad* en antropología molecular para el estudio de la evolución humana, los flujos migratorios, etc. **Utilidad**

que se extiende a la ciencia forense, por su valor como marcador en la identificación de personas o el esclarecimiento de relaciones de parentesco.

3) La Biología Molecular ha acrecentado los conocimientos sobre el papel central de la mitocondria en el metabolismo celular. Al mismo tiempo se han clarificado definitivamente los aspectos bioenergéticos de la mitocondria en relación con el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el necesario acoplamiento de ambos procesos.

4) Nuevos aspectos que prometen ser decisivos son su participación en el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Su interés creciente en oncología se debe a su papel central en la apoptosis o suicidio celular, que impide en condiciones normales (6).

Desastres masivos

En Estados Unidos, en el acto terrorista del 11 de Septiembre del 2001, donde las torres gemelas de New York se derrumbaron en dos montones de escombros, muchos cuerpos quedaron molidos en pequeños fragmentos, mientras que otros fueron incinerados totalmente. Por lo cual hubo la necesidad de identificar confiablemente los cuerpos y restos de estos comparando el ADN recuperado con el de objetos personales y el de familiares cercanos. Pero en algunos casos el ADN recuperado se encontraba gravemente degradado haciendo imposible confiar en el ADN nuclear, para estas condiciones fue utilizado el análisis de ADNmt. (7)

Análisis forense de muestras históricas

El caso resuelto por ADNmt de la familia real rusa Romanov, inicialmente la investigación fue realizada en 1994 cuando los restos hallados se sospechaba eran de la familia real rusa, que fue ejecutada por un pelotón de fusilamiento de Bolshevik en 1918, se analizó usando una combinación de ADNmt y marcador de sexo por análisis STR y PCR. Aun cuando las muestras de hueso analizadas eran de más de 70 años de antigüedad el análisis con marcadores STR de un autosoma rindió perfiles constantes en

la secuencia de ADNmt de la familia real que coincidieron con los perfiles analizados de parientes vivos.

El ADNmt del supuesto Zar fue demostrado por dos moléculas uno que coincidía con la muestra de referencia viva y el otro por presentar una Heteroplasmia (fenómeno en el que en un mismo individuo pueden coexistir moléculas de ADN mitocondrial que presentan alguna diferencia puntual) que en ese entonces se consideraba raro, esto llevo a la especulación de la confiabilidad de los resultados. Sin embargo, un análisis independiente en el hermano del Zar. Georgij Romanov, realizado por el laboratorio de identificación de ADN de las fuerza armadas en Rockville, descubrió que este compartía una heteroplasmia en la misma posición en la molécula de ADNmt, esto disipó con eficacia cualquier duda. (3)

Especies no humanas en genética forense

El análisis forense del ADNmt animal ha sido utilizado cuando este material animal (generalmente pelos de animales domésticos, perros gatos etc.) se encuentra en escenas del crimen y en investigaciones de tráfico de especies en peligro de extinción. El ejemplo del caso de un homicidio, fue demostrar, utilizando 10 el dinucleotido felino específico STRs, de los pelos del gato en la chaqueta de cuero manchada de sangre hallados en la escena del crimen, con un gato que pertenecía al sospechoso del asesinato. En otro caso más reciente, la condena de un hombre por el asesinato de una niña de 7 años en California fue apoyado por el análisis del ADNmt en los pelos de perro que concordaron con un animal doméstico que pertenecía a la víctima. En el caso de especies en peligro de extinción, los métodos se orientan en el gen que codifica el citocromo b ADNmt, específico de cada especie. (3)

1.3 Eva mitocondrial (ancestro femenino de la población humana actual)

El ADN es, sin la menor duda, la molécula más importante de la vida. En la cadena del ADN se encuentra la información que determina la estructura de las proteínas, así como

las instrucciones para el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celular. El ADN ha sido el artífice de la evolución de las especies desde el origen de la vida en nuestro planeta hace más de 3 billones de años. (8)

La genética molecular se ha desarrollado de forma extraordinaria durante los últimos 25 años. A este progreso en el campo del conocimiento debe añadirse el desarrollo de la *tecnología del ADN recombinante*, que ha permitido disponer de herramientas de análisis inimaginables hace sólo unos años. (8)

Según la teoría genetista, la Eva mitocondrial habría sido una **mujer africana** que en la evolución humana correspondería al **ancestro femenino** que poseía las mitocondrias de las que descienden todas las mitocondrias de la población humana actual. Por ello si se sigue la línea genealógica por vía materna de cada persona en el árbol genealógico de toda la humanidad, la Eva mitocondrial correspondería a un único antepasado femenino de la que diverge toda la población actual de Homo Sapiens.

Podemos imaginarnos la molécula de ADNmt como un collar de 16,569 perlas. Cada perla tiene un número y están puestas en orden desde el 1 hasta el 16,569. Además, cada perla tiene una letra que puede ser A, T, C ó G, dependiendo de cuál sea su base nitrogenada. El cambio de una letra por otra se conoce como una **mutación**. Usualmente, la detección de mutaciones en el ADNmt se hace por medio de pruebas de restricción. Cada uno de nosotros tiene aproximadamente 175 mutaciones en el núcleo y sin embargo nos consideramos normales. Pues bien, el ADNmt es tan pequeño que en él ocurre solamente una mutación cada 3 mil años. Esas mutaciones nos permiten rastrear las migraciones humanas que han ocurrido por todo el mundo desde que surgió el ser humano en África hace unos 150,000 años. La mayoría de los ADNmt indígenas tienen sus **orígenes en Asia**. Hace unos 25,000 o 30,000 años, un grupo de siberianos cruzó el Estrecho de Bering, entrando así el ser humano por primera vez al Nuevo Mundo. (9)

1.4 La población humana

La totalidad de las características que poseemos los seres vivos las hemos heredado de nuestros padres y han sido transmitidas a nosotros desde las postrimerías del origen del hombre. Los experimentos que realizó **Mendel** en la década de 1860 permitieron

comprobar que las distintas características de un individuo se encuentran bajo el control de dos factores distintos, que hoy conocemos como **genes**, provenientes de cada uno de nuestros padres. Del mismo modo, es posible distinguir entre las características físicas del individuo, a las que denominamos **fenotipo**, y la composición genética exacta de aquél, que se conoce como **genotipo**. (8)

Muchas de las características que sirven de base en identificación humana, pueden aplicarse aquí también. La región control del ADNmt es usada para estudios de evolución humana, origen de poblaciones, estudios filogenéticos. La población humana se divide en **tres poblaciones raciales** principales o razas, **caucásicos, negros y asiáticos**. La divergencia entre razas se produjo hace unos 10,000-50,000 años. Cada raza se divide a su vez en grupos étnicos o subpoblaciones. No obstante el concepto de raza, es mas una categoría sociológica o cultural que biológica, por ejemplo, las características físicas utilizadas en la catalogación de los individuos en razas son muy limitadas (color de piel, tipo de pelo y tamaño o forma del cuerpo). (10)

Los genetistas han estudiado el ADNmt, las formas presentes en nativos americanos y lo han clasificado en cuatro grandes grupos o haplogrupos: **A, B, C y D**; propusieron que sólo un haplotipo por haplogrupo entró en América provenientes de Asia y que esto ocurrió en tres oleadas migratorias correspondientes a los tres grupos Lingüísticos.

En los últimos cinco siglos, varias poblaciones originales entraron en contacto, interactuaron entre sí y se mezclaron, produciendo el mestizaje. Ellos son en orden cronológico, los Amerindios, un grupo cercano derivado del Asia Central, los Europeos, mayoritariamente Españoles; y los Africanos, quienes fueron traídos como esclavos a Latinoamérica desde Guinea Ecuatorial. (11)

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

2.1 Criminalística

Es la disciplina que aplica fundamentalmente los conocimientos, métodos y técnicas de la investigación de las ciencias naturales (Biología, Química y Física) en el examen del material sensible significativo relacionado con un presunto hecho delictuoso, con el fin de determinar, en auxilio de los órganos encargados de administrar justicia, su existencia, o bien reconstruirlo, o bien señalar y precisar la intervención de uno o varios sujetos en el mismo.

2.1.1 Material sensible significativo

El material sensible esta constituido por todos aquellos elementos (objetos, huellas, etc.) que son aprehendidos o percibidos mediante la aplicación de nuestros órganos de los sentidos (vista, oído, tacto, olfato y gusto). A fin de lograr una adecuada captación del material sensible, nuestros sentidos deberán estar debidamente ejercitados para esos menesteres, y de preferencia deben ser aplicados al mismo objeto, para evitar toda clase de errores y distorsiones. Es decir, el material sensible que se selecciona para ser sometido a estudio, debe de estar íntimamente relacionado con el hecho que se investiga. (12).

Presunto hecho delictuoso:

Se habla de “presunto” hecho delictuoso, ya que cuando el experto en Criminalística interviene en la investigación de un hecho determinado, no puede saber de antemano si se trata o no de un verdadero delito. Si se solicita su intervención es por que se cree, se “presume” que se ha cometido un delito, pero la verdad sólo se sabrá después de concluidos los estudios e investigaciones.

Evidencia

Es una certeza clara, manifiesta y perceptible de una cosa, que nadie puede racionalmente dudar de ella. (12)

2.1.2 Cadena de custodia

Es el procedimiento documental que pretende asegurar a través de un seguimiento trazable, fundado en la responsabilidad asumida por los intervinientes, que la muestra que se procesa en el laboratorio no sea alterada, sustituida o cambiada, desde el momento en que está se recoge hasta el momento que finaliza el análisis. El objetivo de la cadena de custodia es evitar los errores que no están relacionados con el método analítico. Por lo tanto, es importante que todo lo que le ocurre a una muestra desde que entra en el laboratorio, antes durante y después de su análisis, debe estar perfectamente documentado.

2.1.3 Clasificación de indicios

Atendiendo a su naturaleza, los indicios se pueden clasificar y subclasificar en:

- a) Químicos.
- b) Físicos
- c) Biológicos

Químicos.

Aquellas sustancias líquidas, sólidas y gaseosas que presentan una composición química determinada y las cuales pueden ser introducidas al organismo por vía oral, aérea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, por absorción en la piel provocando intoxicaciones y enfermedades: así como sustancias químicas vertidas en la superficie corporal de forma accidental o intencional provocando lesiones desde leves hasta las que pueden dejar cicatriz perpetua y notable.

Físicos:

Son todos aquellos objetos materiales que ocupan un lugar en el espacio, como por ejemplo: un bat, un arma de fuego, una piedra, una navaja etc, con los cuales se puede potenciar la fuerza humana y ocasionar lesiones en la integridad corporal de una persona desde leves a mortales. (12)

Biológicos:

- 1.- Sangre.
- 2.- Semen
- 3.- Orina.
- 4.- Saliva.
- 5.- Excrementos.
- 6.- Vómito.
- 7.- Contenido gástrico.
- 8.- Identificación y cuantificación de drogas de abuso: biológicas y sintéticas.

2.1.4 Recuperación y limpieza de muestras

Lo esencial en la recuperación del material es minimizar la contaminación de las muestras con ADN 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 emitidos por el laboratorio. 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 estériles (si se entra en la escena del crimen) e instrumentos esterilizados o adecuadamente limpios 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 laboratorio una vez que se dio fe ante el Ministerio Público, asegurando que si hay muestras con cadena de custodia, esta se mantenga.

6.- Es fundamental y básico tomar muestras testigo de la víctima y sospechoso. De ser posible extrayéndole sangre, o en su defecto con frotis de la cavidad bucal (siempre con autorización de la persona implicada).

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

Normas generales en casos especiales:

Estas normas generales se complementarán 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 anticoagulante. También se pueden utilizar algodón, gasa, o hisopos estériles, para la recolección, dejándolos secar antes de almacenar.

Indicios húmedos. Se debe dejar 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 la calidad del indicio (las enzimas restrictoras pueden degradar el ADN 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 posible, 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 recomiendan, debiendo ser recogidos con pinzas. Debe evitarse un error 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.

Huesos. Deben ser manipulados con guantes estériles para evitar la contaminación con células epiteliales o sudor, como se indicó previamente. En lo posible trabajar con los huesos recientemente desenterrados, sin lavar. El lavado, secado y posterior almacenamiento estando húmedo puede enmohecer 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 utilizando una brocha suave.

Una vez recogido el indicio debe conservarse en refrigeración (+4°C) o proceder a congelación si la muestra lo requiere. Se debe tener en cuenta que la conservación en estas condiciones, muy posiblemente invalide las muestras para otros análisis diferentes a la identificación de ADN. (13)

2.2 Célula:

Las células constituyen la forma más pequeña de vida. Las células que contienen un núcleo que almacena el material genético se denominan **eucariotas**, mientras que las células sin núcleo se designan como **procariotas**. En las células eucariotas el ADN se encuentra en estructuras denominadas **cromosomas**. Las células tienen la capacidad de desarrollarse y dividirse y constituyen verdaderas fábricas en las que se producen millares de proteínas con distintas funciones en los espacios intracelular y extracelular, las que definen la especialización celular. Por otra parte, cada una de las moléculas de una célula determinada es capaz de realizar un considerable número de reacciones químicas con moléculas procedentes de otras células. (8)

El ADN de cada célula es capaz de codificar para más de 50.000 proteínas distintas. Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran situados de forma lineal en la cadena del ADN y están empaquetados en los cromosomas. Cada célula de nuestro organismo (somática) tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares; cada par de cromosomas ha sido heredado de cada uno de nuestros progenitores. (8)

Como ya sabemos, la célula es la unidad fundamental de vida. Es un cuerpo con volumen que transforma energía y es capaz de transferir información. Todo ser vivo está formado al menos por una célula. (15)

2.2.1 Estructura de la célula animal

★ **Membrana celular o plasmática:** La envoltura externa que contiene a todo, es una estructura viva con actividad metabólica fundamental a través de la cual pasan materiales hacia dentro y hacia fuera de la célula.

★ **Citoplasma:** cuerpo y materia viviente de la célula, que contiene a los organelos y se encuentra entre la membrana y alrededor del núcleo.

Retículo endoplasmático: funciona en el transporte de materiales (para la síntesis de proteínas) desde el medio extracelular hasta el citoplasma y del núcleo hasta el citoplasma.

Mitocondrias: estructuras en forma de salchichas esparcidas a través del citoplasma, producen energía a través de la respiración celular.

Ribosomas: contiene altas concentraciones de ácido ribonucleico (ARN), son centros de síntesis de proteínas

Lisosomas: estructura en forma de vesícula que contiene enzimas que catalizan el rompimiento de las grandes moléculas de grasas, proteínas y ácidos nucleicos en moléculas más pequeñas.

Aparato de Golgi: participa en el proceso de la síntesis de proteínas, esta formado por un grupo de sacos aplanados, paralelos y de superficie suave, que se encuentran dentro del citoplasma.

Centríolos: pequeñas partículas en forma de barril, participan en la división celular.

★ **Núcleo:** centro de control de todos los procesos vitales que lleva a cabo la célula.

Membrana nuclear: doble membrana con poros que regulan el flujo de material entre el núcleo y el citoplasma.

Cromatina: en la cromatina el ácido nucleico es el ADN

Nucleolos: dentro del núcleo y asociado con los nucleolos se encuentra el ARN. El ARN mensajero puede pasar del núcleo al citoplasma.

2.3 ADN (Ácido desoxirribonucleico)

El ADN se encuentra dentro del núcleo celular, organizado en unas estructuras denominadas *cromosomas*. Un cromosoma típico es una estructura simétrica constituida por dos elementos idénticos, las **cromátides**, cada una de las cuales está formada por una molécula única de ADN de doble hélice con sus proteínas asociadas, que recorre el cromosoma de forma continua de un extremo a otro. Ambas cromátides conectan entre sí en una constricción, denominada **constricción primaria o centrómero**, que resulta crucial para la orientación del cromosoma durante la división celular. (8)

Está formado por una cadena doble de *nucleótidos*, cada uno de los cuales contiene: azúcar desoxirribosa, bases nitrogenada (adenina, citosina, guanina, timina), un radical fosfato. Los nucleótidos se unen formando largas cadenas, en un orden y proporción determinadas (Fig. 1).

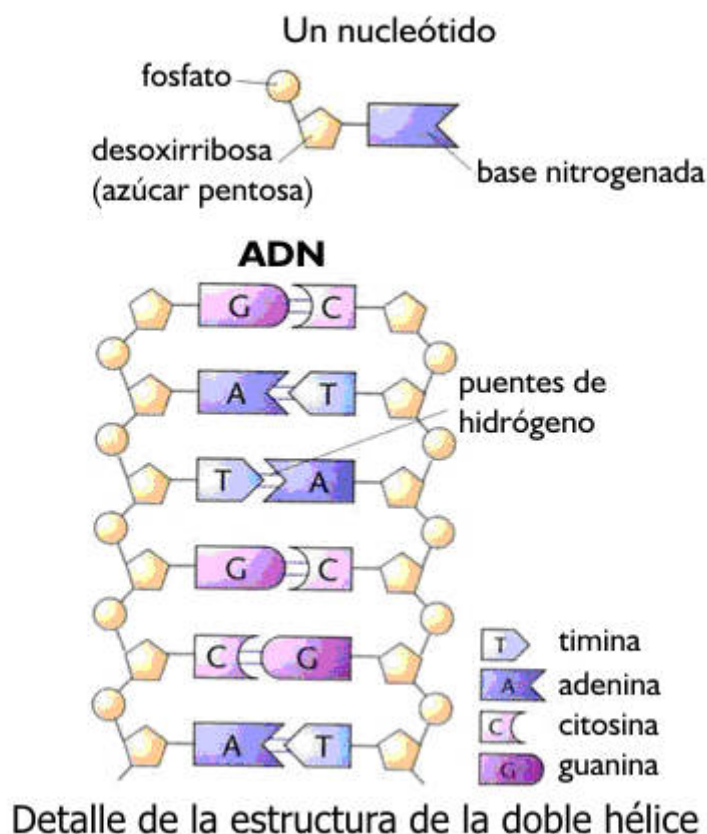


Fig. 1 Estructura del ADN formado por una cadena doble de *nucleótidos* unidos entre sí por puentes de hidrógeno, cada uno de los cuales contiene: azúcar desoxirribosa, bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina, timina) y un radical fosfato.

El ADN es, sin la menor duda, la molécula más importante de la vida. En la cadena del ADN se encuentra la información que determina la estructura de las proteínas, así como las instrucciones para el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celular.

El ADN ha sido el artífice de la evolución de las especies desde el origen de la vida en nuestro planeta hace más de 3 billones de años. (8)

El ADN, es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y el funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus.

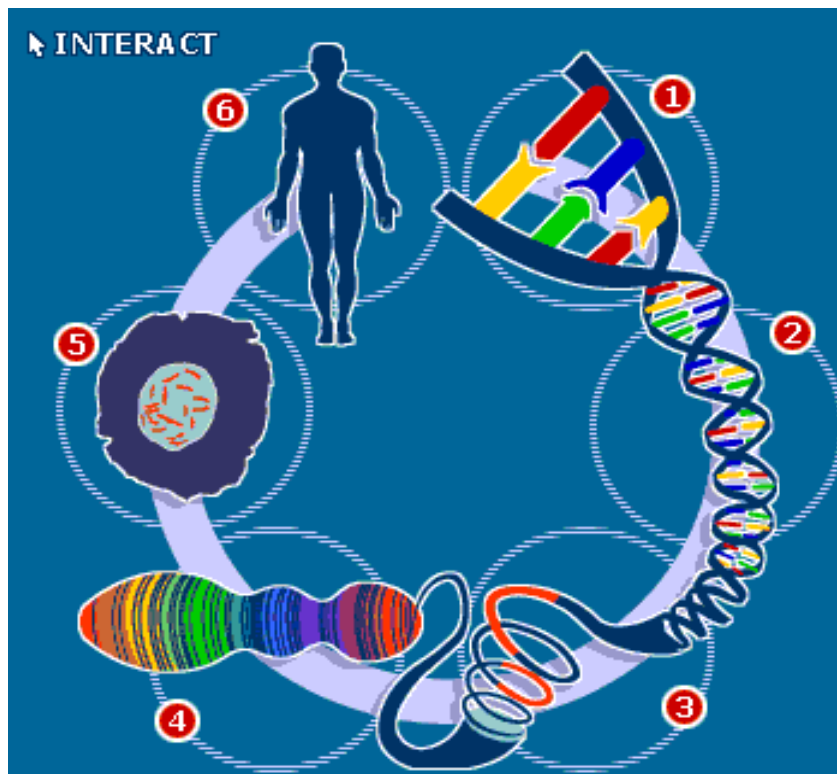


FIGURA (2). ADN y su localización: 1 y 2: el ADN es una molécula formada por unidades llamadas nucleótidos; 3 y 4: se encuentra enrollado y empaquetado formando unas estructuras llamadas cromosomas; 5: los cromosomas se localizan dentro de las células, en un compartimento denominado núcleo; 6: todas las células que contiene nuestro organismo contienen el mismo ADN (16)

El papel principal de las moléculas de ADN es el de ser portador y transmisor de la información genética entre generaciones. El ADN a menudo es comparado con un manual, ya que este contiene las instrucciones para construir otros componentes de las células, como moléculas de ARN y proteínas. Los segmentos de ADN que llevan esta información genética se llaman *genes* (Fig.2), pero otras secuencias de ADN tienen

funciones estructurales, o están implicadas en la regulación del empleo de esta información genética. Según su localización y estructura nos encontramos con dos tipos de ADN en el organismo, el *ADN nuclear*, al que habitualmente se hace referencia cuando se habla de ADN sin especificar nada, situado en el núcleo de las células, y el *ADN mitocondrial* (ADNmt), localizado en el interior de unos organelos celulares denominados mitocondrias. Ambos tienen interés médico-forense y poseen características que los hacen complementarios a la hora de la identificación y de investigar las relaciones de parentesco. (2)

2.3.1 La huella digital del ADN

La individualidad genética de una persona está definida por la información genética que heredó de sus padres. Cada ser humano tiene un fenotipo o apariencia física característica, porque posee una información genética única. Los *gemelos idénticos* son la excepción de esta regla, puesto que poseen el mismo genotipo o material genético. Todas las células de un individuo, ya sean de la raíz del pelo, leucocitos, espermatozoides, piel, hueso, etcétera, tienen la misma información genética, incluso la información necesaria para codificar potencialmente el cuerpo humano completo. Estos dos principios, el de la **individualidad genética** de cada persona y el de que todas las células de un mismo individuo poseen **la misma información genética**, son la base para los estudios de la huella digital del ADN. (17)

La especificidad de esta tecnología, que en conjunto se conoce como “huella digital” del ADN, ha sido la clave del éxito que ha alcanzado la identificación de individuos. Otros factores que han favorecido los análisis del ADN son el hecho de que cualquier tejido puede ser útil para el análisis del material genético, el requerimiento de muestras pequeñas, la facilidad de replicar el ADN millones de veces en la mesa del laboratorio y la estabilidad del mismo. (18)

2.4 Degradación del ADN después de la muerte celular

Existen dos factores como son el **tiempo transcurrido** y las condiciones del **medio ambiente** (ej. humedad, temperatura, etc.) que ocasionan la degradación del material genético. Esta circunstancia ocasiona que al quedar afectado el ADN, su análisis mediante marcadores genéticos nucleares sea en ocasiones inviable.

La medicina forense para este tipo de muestras dispone en la actualidad del análisis del ADNmt. (19))

La degradación del ADN endógeno, inicia después de la muerte celular. En los humanos, después de 4 a 5 minutos comienza la autólisis celular. Mientras que las células del cuerpo son privadas de oxígeno, el CO₂ en la sangre aumenta, el pH disminuye y los desechos que se acumulan intoxican a las células. Al mismo tiempo las enzimas celulares desechadas incluyendo lipasas, proteasas, amilasas y las nucleadas (actividad nucleásica) comienzan a disolverse en las células. Inmediatamente las células se rompen vertiendo líquidos ricos en nutrientes y fomentando así el crecimiento de microorganismos internos y ambientales (principalmente bacterias hongos y protozoos) implicados en la posterior putrefacción de los restos. (20)

Como se menciona después de que la actividad nucleásica ha finalizado, se produce la colonización del organismo por bacterias, hongos y, en algunos casos, insectos que continúan el proceso de descomposición. Finalmente, son procesos químicos, principalmente de hidrólisis y oxidación (Fig. 3), los que completan la degradación del material genético. (21)

2.4.1 Hidrólisis

La fragmentación del ADN puede producirse mediante la rotura directa de los enlaces fosfodiéster (que unen las diferentes desoxirribosas entre sí) o de los enlaces N-glicosídicos (que conectan éstas a las bases nitrogenadas).

En muestras de sangre es el **hierro presente en la hemoglobina** la causa de la degradación del ADN pues cataliza la ruptura de las uniones fosfodiéster entre los

azúcares adyacentes. Además, la hemoglobina inhibe la reacción en cadena de la polimerasa, por eso es tan importante eliminarla en un proceso anterior a la extracción a partir de sangre mediante sucesivos lavados de la muestra en un tampón. (13)

2.4.2. Oxidación

El daño oxidativo en el ADN está producido principalmente por **radicales libres** superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo (OH^-). Todos ellos son esencialmente subproductos de reacciones celulares endógenas, aunque también pueden ser generados tras la exposición de la célula a radiaciones ionizantes o luz ultravioleta o por degradación bacteriana y/o fúngica. (21)

Desde del punto de vista de la Biología Molecular, a pesar de que la mayoría de las células diploides humanas contienen miles de millones de bases de ADN nuclear y los millones de copias de ADNmt, su deceso es tan rápido que al cabo de meses sino es que de semanas puede ya no haber alguna célula de ADN por amplificar aún por PCR. Sin embargo en algunos casos esta degradación se puede detener, con métodos creados para detener o inactivar las nucleasas e inhibir la acción de los microorganismos; como la desecación rápida (Ej. momias naturales), y altas concentraciones de sal así como procesos en los cuales se separa la carne del individuo, limitando así el sustrato que fomenta a los microorganismos evitando la putrefacción y degradación subsecuente. (20)

La mayoría de las muestras más antiguas de las que se ha podido recuperar ADN de forma reproducible proceden de lugares con baja temperatura. En un excelente trabajo publicado en 1989, Svante Pääbo profundizó en el conocimiento de las características físico-químicas del aADN (ADN antiguo) así como en los procesos que contribuyen a su degradación. Tras estudiar doce especímenes de diferente procedencia y antigüedad mediante diversas técnicas, Pääbo concluyó que su material genético se encontraba modificado de forma similar en todos ellos, siendo la **fragmentación** y las **modificaciones oxidativas** las manifestaciones más abundantes. Al final de este trabajo señaló una de las principales dificultades de los estudios de aADN desde el desarrollo

de la PCR: la contaminación con ADN exógeno, a la vez que recomendó ciertas precauciones para minimizar su efecto. (21)

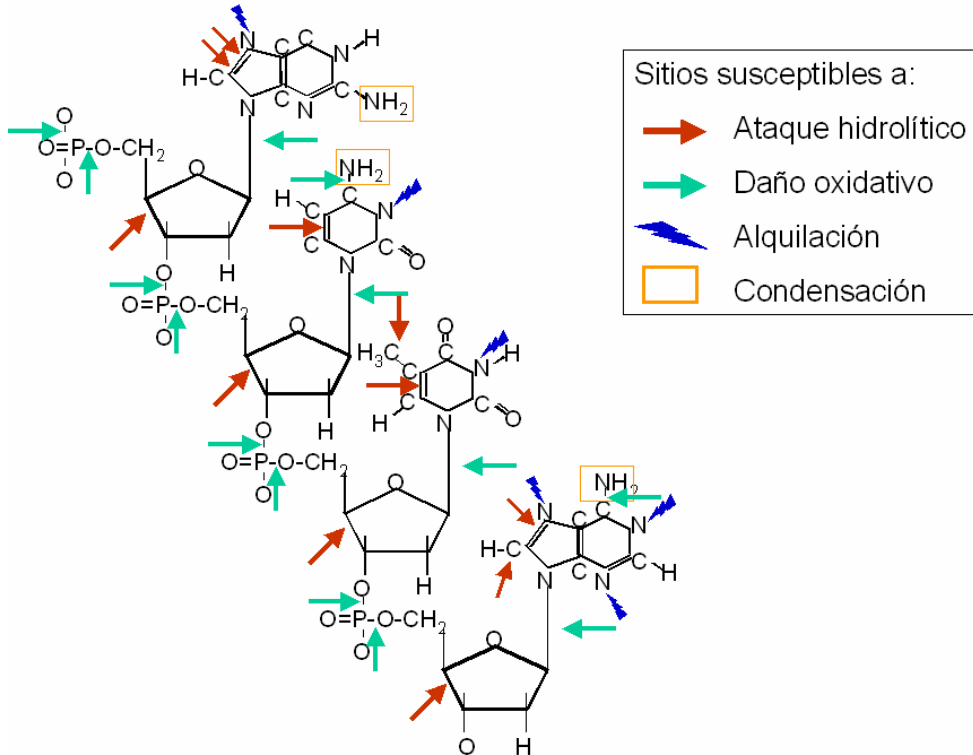


Figura 3. Lugares de la cadena del ADN susceptibles a diferentes mecanismos de degradación: ataque hidrolítico, daño oxidativo, alquilación y condensación. Modificado de POINAR 2002. (21)

2.4.3 Factores que influyen en la conservación del ADN antiguo

La velocidad y el grado de descomposición del material genético de un resto dependen de diversos factores tanto endógenos como exógenos. Puede decirse que el éxito en la obtención de información genética a partir de material antiguo está condicionado por tres factores que mencionamos a continuación:

- ❖ El tipo de material de estudio.
- ❖ Las condiciones de enterramiento.
- ❖ Las condiciones de almacenamiento.

Entre las variables que pueden tener una influencia significativa en la preservación del ADN destacan la **naturaleza** de la muestra estudiada (hueso, diente, tejido blando...), su **procedencia**, y su **antigüedad**. (21)

2.5 Aplicaciones forenses del ADN

A mediados de los 80 comenzaron a desarrollarse sistemas de identificación de individuos basados en el estudio de polimorfismos de ADN. A partir de 1990, los análisis mediante la utilización de la técnica de PCR fueron ganando espacio en los laboratorios forenses, sobre todo por requerir cantidades ínfimas de ADN. La técnica de identificación por ADN ha logrado aceptación científica para las pericias forenses y se ha validado por su poder de discriminación, especialmente en los casos de exclusión de relación biológica. Como primera instancia, dentro de los sistemas de identificación por ADN se recupera el análisis del material genético de tipo nuclear; pero en algunas ocasiones las dificultades surgen de la susceptibilidad que tiene la molécula de ADN a la modificación química con sustancias tales como la formalina, a la pérdida de su estructura por acción de Hipoclorito de sodio y, por último, si no ha sido digerido por los procesos naturales de degradación enzimática, con el tiempo comienza a fragmentarse por pérdida de sus regiones con alto contenido de adeninas y guaninas. (22)

El ADN es la molécula responsable de la herencia, es responsable del almacenamiento y transmisión de la información de las células y los virus. La ciencia que se encarga del análisis de los genes utilizando diversas técnicas, se denomina Biología molecular. La utilización de la tecnología del ADN recombinante en la identificación de individuos en casos de medicina forense y de parentesco biológico. Es una de las aplicaciones más exitosas y espectaculares de esa tecnología en el diagnóstico médico. El análisis del ADN se utiliza para identificar a individuos en forma rutinaria en los países desarrollados y se está incrementando cada vez más en los países en vías de desarrollo. Las pruebas del ADN se utilizan para identificar cadáveres, criminales que han modificado su fenotipo con cirugía plástica, individuos involucrados en delitos de violación, crímenes y asaltos, así como en casos de disputas de paternidad u otros

problemas de consanguinidad en los cuales se desea conocer la certeza de la relación biológica entre dos individuos. (18)

2.6 Marcadores

El análisis del ADN con fines de identificación implica el empleo de técnicas de laboratorio que utilizan diversos "marcadores" o "sistemas", los que podrían definirse conceptualmente como instrumentos que investigan esos fragmentos de ADN en los cuales se instalan las secuencias repetitivas aludidas. Los resultados que se logran de este análisis de diversas áreas de ADN configuran, en conjunto, el perfil genético propio de cada individuo. (23)

A cada fragmento variable de ADN que estudiamos en identificación genética lo denominamos **marcador, sistema o locus** (loci, en plural) y los alelos son las variantes (posibilidades) que tiene cada uno (tabla 1). Cada marcador tiene un nombre propio que suele hacer referencia a su localización dentro de la molécula de ADN; por otro lado, la mayoría de los alelos de cada marcador se representan con números.

Como puede suponerse hay que analizar varios marcadores en una muestra para poder identificarla pues dos muestras distintas pueden coincidir por simple azar en los alelos de un marcador. A mayor número de marcadores analizados, mayores posibilidades de distinguir dos muestras sin error. El perfil genético de un individuo o de una evidencia es la sucesión de los alelos que presenta en cada marcador (tabla 1). (13)

MUESTRA	TH01	TPOX	CSF1PO	D3S1358	VWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820	SEXO
ALELOS	6-9,3	8-11	10-10	16-16	16-17	20-21	10-13	30-30	14-15	12-12	10-11	10-10	XY

Tabla 1. Perfil genético de una muestra biológica. Marcadores y respectivos alelos. (18)

Un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear en una familia, son caracteres estables que se transmiten por herencia Mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie. Es la capacidad que tiene el ADN de hacer copias o replicas de su molécula, es un proceso fundamental para la transferencia de la información genética de generación en generación. Esta capacidad es el fundamento del análisis que se aplica en la metodología de la Medicina Forense. Las moléculas se replican de un modo semiconservativo. La doble hélice se separa y cada una de las cadenas sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. El resultado final son dos moléculas idénticas a la original. (2)

Las características que debe poseer un marcador o identificador genético son:

- ❖ Patrón de herencia bien establecido
- ❖ Elevado polimorfismo
- ❖ Alto grado de heterocigosidad
- ❖ Detección fiable de los alelos
- ❖ Datos poblacionales de frecuencias alélicas genotípicas y/o fenotípicas establecidas.
- ❖ Herencia independiente de los marcadores usados.
- ❖ Tasa de mutación baja.
- ❖ Analizable mediante un método simple, rápido y reproducible.
- ❖ Requerir poco material para el análisis. (24)

Los marcadores genéticos tienen una enorme utilidad práctica en genética médica: para el mapeo de un gen en una determinada región de un cromosoma por análisis de ligamiento, para el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas, para evaluar personas de bajo y alto riesgo con predisposición a padecer trastornos frecuentes en el adulto, para las pruebas de paternidad, para aplicaciones forenses en la identificación de restos de un crimen y para la tipificación de tejidos en trasplante de órganos. (25)

El hallazgo de patrones genéticos en estos rastros biológicos y su comparación con los perfiles de las personas involucradas, hacen posible establecer una concordancia (si los perfiles coinciden) o descartarla (si los mismos difieren) y de este modo señalar o excluir a los involucrados como fuente de las muestras, con un elevado grado de certeza. (23)

El análisis de marcadores genéticos con el fin de la individualización de cada muestra de semen es extremadamente importante y muy útil especialmente en casos viejos de abuso y ataque sexual. (26)

Esto los convierte en una herramienta valiosa para hacer cartografía genética, análisis de ligamiento, estudios de población y asociación con enfermedades. A diferencia de los marcadores autosómicos, los marcadores STR en el cromosoma Y (Y-STR) tienen cualidades particulares que los hacen excepcionalmente útiles para estos propósitos. Los marcadores YSTR se encuentran en la región no recombinante del cromosoma Y (non recombining portion of the Y chromosome, NRY) y producen un perfil haploide cuando se amplifican a partir de un ADN masculino. Puesto que el cromosoma Y se transmite de padre a hijo varón prácticamente sin recombinarse, estos marcadores individuales no se combinan usando la regla del producto, como se hace comúnmente con los STR autosómicos que se presentan en cromosomas homólogos. (27)

2.6.1 Polimorfismos

Las variaciones en la secuencia del ADN entre individuos se conocen con el término de “polimorfismos”. Estos polimorfismos son útiles al examinar el ADN en la genética forense, pues muestran suficiente variabilidad entre individuos como para lograr un alto grado de discriminación cuando se realiza una prueba con múltiples loci, en especial, cuando se determina el número de repeticiones cortas en tándem (short tandem repeat, *STR*) presentes en diferentes cromosomas. (27)

Los polimorfismos son elementos clave en toda investigación genética humana. Poder distinguir diferentes formas de un gen o distintos segmentos del genoma proporciona herramientas cruciales para una amplia gama de aplicaciones. (25)

A medida que los biólogos moleculares fueron investigando y descubriendo los secretos del ADN, encontraron que a veces aparecían tramos cortos de ADN humano que variaban de una persona a otra. Es decir, el ADN humano no era totalmente igual en todas las personas, existían zonas que eran polimórficas pues variaban en la secuencia u orden de bases nitrogenadas. Estas variaciones de secuencia se llaman polimorfismos genéticos ya que permiten distinguir a los individuos. (13)

2.6.2 Identificación personal

La aplicación del análisis de los polimorfismos genéticos, al estudio de los vestigios biológicos presentes en la escena del delito ha ampliado el alcance de la prueba del ADN. La evidencia biológica es la llave para demostrar la participación de una persona en un hecho delictivo. El análisis se puede aplicar a cualquier tipo de vestigio biológico, sangre, pelos, semen, saliva, tejidos, huesos etc. Y sobre objetos que los contengan. (19)

En ocasiones, la identificación de cadáveres mediante las técnicas clásicas (huellas dactilares, placa dentaria, medidas antropológicas, etc.) de la medicina forense no permiten identificar con precisión la identidad de unos restos cadavéricos y es necesario recurrir a técnicas de análisis de ADN. En las dos últimas décadas los avances en biología molecular han permitido dotar a la medicina forense con una valiosísima herramienta para la resolución de casos judiciales tanto en el ámbito penal como en el civil. Efectivamente, hoy mediante el análisis de polimorfismos de ADN somos capaces de precisar con altos índices de probabilidad el autor de una violación, un homicidio o la identidad de un cadáver. (19)

En medicina forense la tecnología del ADN antiguo (aADN) ha sido aplicada con éxito para la *identificación personal* a partir de restos óseos y dentales. Desde el desarrollo del aADN como disciplina, se ha comprobado que el material genético se conserva mejor en tejidos duros (como el hueso o el diente) que en tejidos blandos. De los dos tipos de tejidos duros mencionados, el diente es el que ofrece mayores garantías a la hora de recuperar información genética endógena. Ciertos estudios han demostrado que el ADN puede permanecer en el interior de los dientes en condiciones extremas de humedad, temperatura y acidez. (21)

Así pues, el análisis de ADNmt puede utilizarse en casos en los que sólo puede obtenerse una cantidad limitada de ADN nuclear de la muestra. Por ejemplo, en el tejido óseo, los dientes y el pelo se encuentran a menudo unas cantidades de ADN nuclear tan pequeñas que no se puede obtener un perfil de STR. El análisis del ADNmt resulta especialmente útil en estas circunstancias. (28)

La zona del ADNmt más comúnmente empleada con fines forenses es una región caracterizada por una alta variabilidad entre individuos llamada región de control o **d-loop**. Dentro de dicha zona se encuentran ubicadas dos regiones llamadas región hipervariable 1 (HV1) que se extiende entre las bases 16024 y 16365 y la región hipervariable 2 (HV2) comprendida entre las bases 73 y 340 (Fig. 2). La región de control *no codifica* para proteínas, ARNs de transferencia o ARNs ribosómicos, sin embargo en ella se encuentran ubicados los promotores de las cadenas pesada y ligera, sitios de unión para factores de transcripción mitocondrial o el origen de replicación de la cadena pesada. (19)

Actualmente, en casos de identificación humana se realizan trabajos con métodos antropológicos tradicionales (medida de los huesos e identificación dentaria) así como moleculares, lo cual incrementa el número de casos positivos de identificación. (22)

2.7 ADN en muestras antiguas (aADN)

Según Herrmann y Hummel 1994, el ADN antiguo (aADN: ancient ADN) es “cualquier parte o traza de ADN procedente de un organismo o de partes de él, así como ADN extracorpóreo de un organismo vivo o de una parte de él, que sirva como material de partida en los estudios de biología evolutiva, antropología histórica o ciencia forense”. (21)

2.7.1 Historia del aADN

El primer éxito en la recuperación de secuencias antiguas de ADN consistió en la clonación molecular del ADN obtenido de piel modificada del *Equus quagga*, un équido

de África del Sur extinguido hace unos 140 años. Tras comparar las secuencias del *quagga* con las de otros équidos, estos autores descubrieron que mostraban un estrecho parentesco con las cebras. Un año después Svante Pääbo publicaba secuencias de ADN obtenidas de pieles de momias, de 2500 años de antigüedad, empleando el mismo procedimiento experimental. (21)

La posibilidad de recuperar información genética a partir de restos óseos y piezas dentales ha abierto nuevas perspectivas dentro del campo de la arqueología y en determinados ámbitos de la medicina forense. Mediante el estudio de este material, abundante en el registro fósil, se pueden solventar incógnitas que difícilmente podrían ser resueltas de otra manera. Entre las posibles aplicaciones del aADN en arqueología conviene destacar tres, ampliamente documentadas en la bibliografía: el cálculo del número mínimo de individuos de una *necrópolis*, el diagnóstico de *sexo*, y el establecimiento de *relaciones de parentesco*. En el ámbito de la genética forense, además de las dos últimas aplicaciones mencionadas se ha recurrido a la tecnología del aADN para la identificación personal. (21)

2.8 Estructura del genoma humano

En todas las células somáticas del cuerpo, el ADN se encuentra en estado **diploide**, o sea, existen dos ejemplares de cada cromosoma. Sin embargo, en las células germinales (como consecuencia de la *meiosis* en la gametogénesis) el ADN está en estado **haploide**, es decir, el óvulo y el espermatozoide contienen una única dotación de cada uno de los cromosomas. Cuando ambos gametos se combinan durante la fecundación, el cigoto originado vuelve a ser diploide y el individuo resultante (formado por multitud de células somáticas genéticamente idénticas originadas como consecuencia de la *mitosis*) habrá heredado un 50% de la información genética del padre y el otro 50% de la madre. (6)

El genoma humano contiene, según las últimas investigaciones, alrededor de 30,000 genes (unidades de información genética) los genes están codificados en el ADN; el genoma humano se compone de grandes cantidades de ADN que contiene en su estructura la información genética necesaria para especificar todos los aspectos de la embriogénesis, el desarrollo, el crecimiento el metabolismo y la reproducción: esencialmente todos los aspectos que hacen que un ser humano sea un organismo funcional. (25)

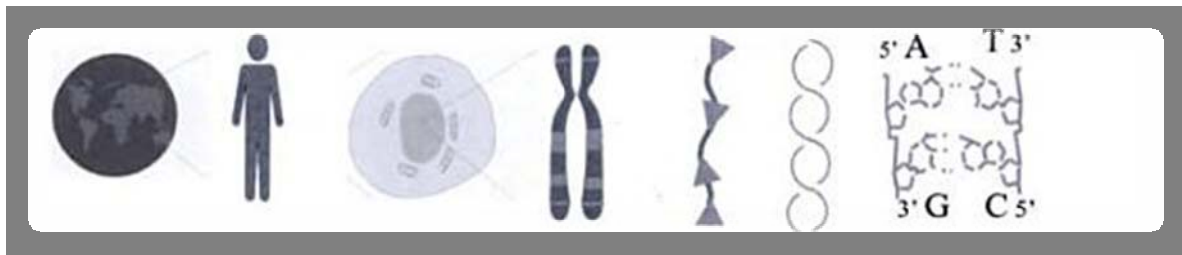
La molécula de ADN tiene la estructura de una escalera formada por azúcares (desoxirribosas), fosfato y cuatro bases nucleotídicas, llamadas adenina (A), timina (T), citosina (C), y guanina (G). El código genético queda determinado por el orden de estas bases y cada gen tiene una secuencia única de pares de bases (fig. 1). Los científicos utilizan estas secuencias para localizar, la posición de los genes en los cromosomas y elaborar el mapa del genoma humano.

Todos los sistemas de ADN a que se hace referencia en un análisis forense se concentran en las zonas **no codificantes del genoma**. Esto significa que no incluyen información acerca de las características físicas o psicológicas, las enfermedades o la propensión a las mismas. (5)

2.8.1 ADN Nuclear .

El ADN nuclear es el ADN que se encuentra en el interior del núcleo celular formando parte de los cromosomas y esta presente en todas las células humanas, excepto en los eritrocitos que carecen de núcleo (Fig.4).

El ADN nuclear mide aproximadamente dos metros de longitud en su totalidad, pero se encuentra dividido y muy compactado en los cromosomas, que son unas estructuras muy densas formadas por ADN y proteínas. El genoma humano nuclear consiste en *22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales, X y Y*, cuya combinación determina el sexo femenino (XX) o masculino (XY). En conjunto cada célula somática contiene 46 cromosomas. (18)



Humanidad Individuo Célula Cromosoma Gen ADN

Fig. 4. El genoma humano: material característico de la especie humana

2.9 Estructura y organización del ADNmt

Las mitocondrias son organelos celulares en los cuales ocurre un proceso indispensable para las células eucariotas: la respiración celular. Durante este proceso ocurre la combustión de los carbohidratos, que permite liberar la energía contenida en su estructura. Los carbohidratos que se utilizan en las mitocondrias provienen principalmente de la fotosíntesis (en las plantas y algunos otros organismos que fotosintetizan) o de la ingestión (en las formas de vida heterótrofas). (6)

Las mitocondrias observadas al microscopio electrónico se ven como esferas o como estructuras en forma de salchicha esparcidas a través del citoplasma. Generalmente se encuentran en las regiones celulares de mayor actividad metabólica, y en mayor número, en células que tienen la mayor actividad metabólica, como son las células hepáticas y las células musculares. Las mitocondrias pueden descomponer los compuestos orgánicos en anhídrido carbónico y agua, cuando esto ocurre energía se libera. Así pues, las mitocondrias son los centros de actividad respiratoria de la célula y dan origen al anhídrido carbónico y agua, que se exhalan al respirar. (29)

El genoma mitocondrial, también llamado ADN mitocondrial (ADNmt), es el material genético de las mitocondrias, los orgánulos que generan energía para la célula. En las células eucariotas el ADNmt se reproduce por sí mismo semi-autonómicamente al ocurrir la división celular.

El ADNmt, al igual que los ADN bacterianos, es una molécula bicatenaria, circular, cerrada, sin extremos. En los seres humanos tiene un tamaño de 16.569 pares de bases,

conteniendo un pequeño número de genes, distribuidos entre la cadena H y la cadena L. Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de la molécula de ADN. En él están codificados dos ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia y 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa (fig. 5). (6)

Cuya secuencia completa fue publicada en Abril de 1981 por un grupo de 14 investigadores del Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council en Cambridge encabezado por S. Anderson, por lo que desde entonces se conoce como **secuencia de referencia o de Anderson**. (2)

El ADN está presente dentro del núcleo de cada célula de nuestro cuerpo. Pero es el ADN de las mitocondrias de la célula el que ha sido usado más comúnmente para construir árboles evolutivos. (Fig.5)

- ❖ Las mitocondrias tienen su propio genoma de alrededor de 16,569 pares de bases, el cual existe fuera del núcleo de las células. Cada genoma contiene 13 genes que codifican proteínas, 22 tARN y 2 rARN.
- ❖ Grandes cantidades de mitocondrias están presentes en cada célula, lo cual requiere un menor número de muestras.
- ❖ Tienen una tasa de sustitución (mutaciones donde un nucleótido es reemplazado por otro) más alta que el ADN nuclear, lo cual hace más fácil la resolución de diferencias entre individuos cercanamente emparentados.
- ❖ Ellas se heredan solo de la madre, lo cual permite trazar líneas genéticas directas.
- ❖ Ellas no se recombinan. El proceso de recombinación en el ADN nuclear (con la excepción del cromosoma Y) mezcla secciones de ADN de la madre y del padre, creando así una historia genética mezclada e ilegible.

Por dichas características el ADNmt es empleado en la **identificación de individuos**, en la creación de **árboles filogenéticos** y como **marcador poblacional**. (30)

Así pues, el Genoma mitocondrial humano está constituido por un sólo cromosoma, que es una molécula circular de ADN de un tamaño de 16,569 pares de bases. En cuanto a su número, hay que precisar que la mayoría de las células tienen varios cientos de

mitocondrias. Además cada mitocondria tiene varias moléculas de ADN, con lo que el número de copias del cromosoma circular en cada célula es de varios miles (Fig.5).

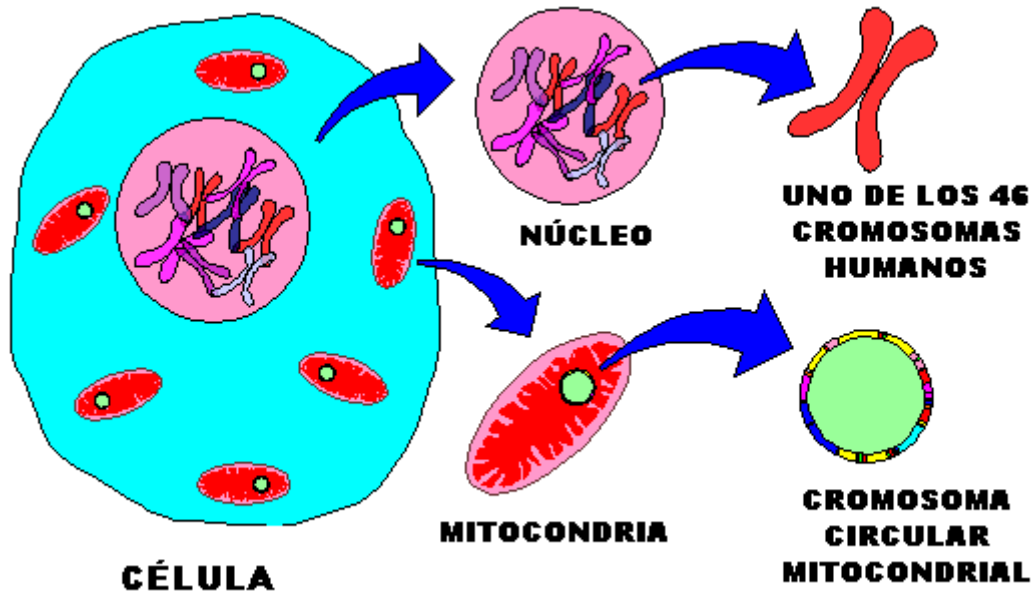


Fig. 5: El cromosoma 47 en el genoma humano: es el pequeño cromosoma mitocondrial. En el esquema podemos observar como en una célula somática típica el ADN se encuentra repartido en dos fracciones. (6).

2.9.1 ADN Mitocondrial como linaje materno

El ADNmt tiene aplicaciones muy específicas, en contraste con el análisis clásico del ADN nuclear. Esto se debe a que el ADNmt es heredado estricta y exclusivamente por línea materna. Este patrón tan especial de herencia molecular permite comparar un vasto tipo de relaciones familiares maternas: hermanas, abuelas, primas, sobrinas, tías e hijas.

En otras palabras; todos los seres humanos reciben **ADNmt exclusivamente de su madre biológica**. Y esta característica tan especial es usada por nosotros para determinar si un individuo descende de alguna mujer determinada. Todas las personas que tengan el mismo linaje materno deben forzosamente tener el mismo ADNmt. Una característica que hay que tener en cuenta para el uso forense de los análisis del ADNmt

es que, además de los hermanos, todos los parientes por vía materna muestran la misma secuencia de ADNmt, lo que significa que las personas de este grupo no pueden ser identificadas por separado. Por esta razón, los vínculos familiares pueden comprobarse muy fácilmente. (5)

Las razones para el tipo de herencia materna son dos fundamentalmente:

- ❖ **Numérica:** las cabezas de espermatozoides contienen sólo unas pocas copias de ADN mitocondrial comparadas con las miles de copias del óvulo
- ❖ **Reconocimiento específico:** parece ser que existe un mecanismo de reconocimiento específico que puede eliminar las pocas mitocondrias parentales que se hayan podido introducir en el óvulo. (16)

El material genético más estudiado en restos antiguos es sin duda el ADNmt. Esencialmente por su mayor abundancia en la célula, que hace más factible la recuperación de fragmentos de ADN intactos. (21)

2.9.2 Organización del ADNmt

La secuencia completa y la organización del ADNmt humano han sido descritas en 1981 por Anderson y colaboradores. La secuencia publicada por estos autores, revisada en 1999 por Andrews y colaboradores. Ha sido utilizada como secuencia de referencia y es conocida como *Cambridge Reference Sequence* (CRS). Como se mencionó el genoma mitocondrial humano está formado por 16,569 pb, es circular, de doble cadena (la cadena pesada (H) rica en guaninas y la cadena ligera (L) rica en citosinas) y no tiene proteínas asociadas. Por lo que el genoma humano está organizado en dos grandes regiones: **la región codificante y la región no codificante** (Fig. 6). (2)

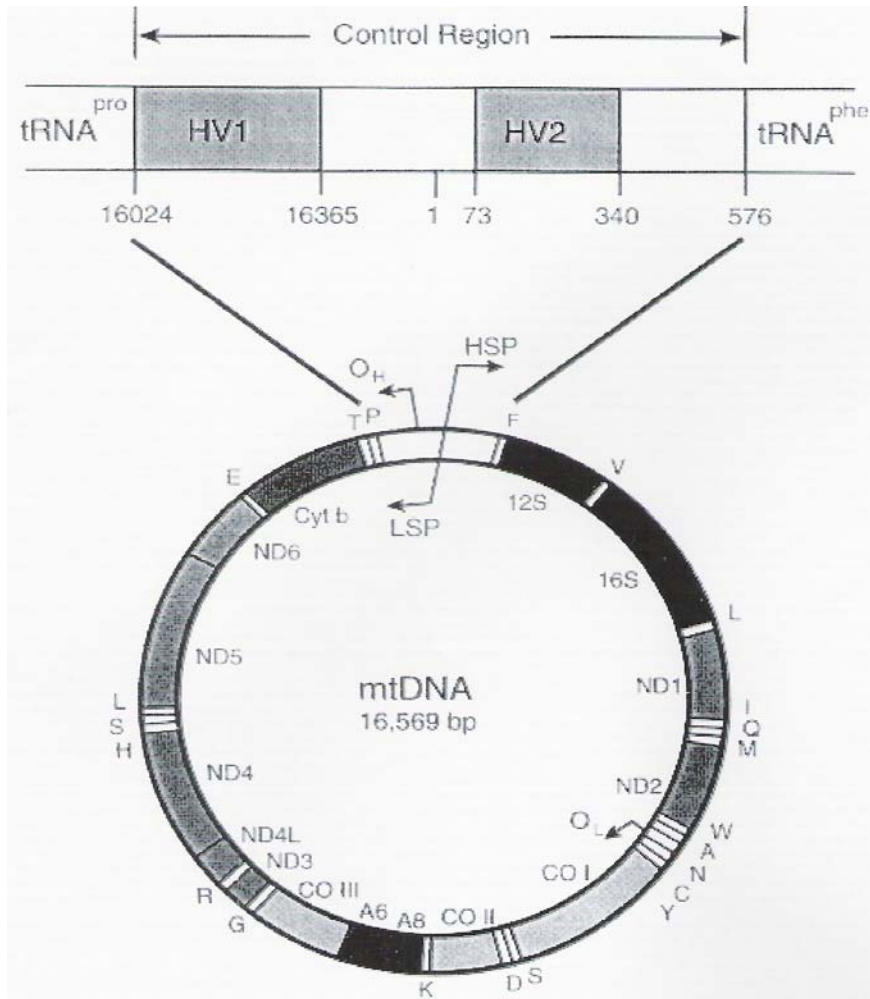


Fig. 6 Mapa del genoma mitocondrial humano y ampliación de la región control (Holland et al. Forensic Science Review. Vol 11 N. 1)

A diferencia de lo que ocurre en las regiones codificantes del ADNmt, la región control tiene una alta variabilidad entre individuos, razón por la cual se ha convertido en objeto de análisis en estudios antropológicos e investigación en genética forense.

2.9.2.1. Región Codificante

Por ADN codificante o expresivo hemos de entender aquellos fragmentos de ácido nucleico que determinan, por el orden de sus nucleótidos, a los diferentes genes que definirán las características de las personas a través de la síntesis proteica, determinando

la secuencia de los aminoácidos de las proteínas que codifican y el grado de expresión del gen en cada tejido y en cada tiempo.

Actualmente, solamente entre el 70 y el 80% del ADN es reconocido como codificante, ya que se conoce con seguridad que forma parte de determinados genes. (2)

2.9.2.2 Región no codificante

Esta región no codificante, denominada **región control o “d-loop”** presenta una gran variación entre individuos y, por tanto, es de utilidad con fines de identificación. (13)

La existencia del ADN no codificante o no esencial es un hecho propio de la biología molecular y del equilibrio de la naturaleza, aunque también es consecuencia del desconocimiento que la ciencia moderna tiene del total del *genoma humano*. En un futuro, gran parte del ADN que actualmente se clasifica como no codificante, podrá ser clasificado de codificante o expresivo, toda vez que se conozcan las secuencias completas de todo el genoma humano. Paradójicamente, este ADN es el esencial para que una investigación forense se lleve a cabo exitosamente, por sus características y peculiaridades, que lo convierten en un gran instrumento para la individualización de los seres humanos. (2)

Todos los sistemas de ADN a que se hace referencia en un análisis forense se concentran en las zonas no codificantes del genoma. Esto significa que no incluyen información acerca de las características físicas o psicológicas, las enfermedades o la propensión a las mismas. (28).

La región D-loop (no codificable) del ADNmt consta de 1124 pares de bases, de la posición 16,024 a 576, donde se encuentran promotores tanto en la cadena ligera como en la pesada, contiene también elementos de replicación y transcripcionales. La región D-loop posee dos regiones hipervariables: HV1 (16,024-16,383) y HV2 (73-372). Estas regiones han sido empleadas en análisis forenses y en diagnósticos médicos. (30)

Por su composición bioquímica, las dos cadenas son diferentes, ya que en la secuencia nucleotídica de una prevalecen las bases **púricas (A y G)**, por lo que es más pesada que su complementaria donde priman las bases **pirimidínicas (C y T)**; en consecuencia, a la primera de las cadenas se le denomina **H** (*heavy*) y a la otra **L** (*light*). (16)

Las esenciales características del ADN no codificante lo convierten en el objeto de la Biología forense. De este modo, en principio, su falta de función conocida es compensada por su aplicación a la investigación médico-legal, podemos decir que desde el punto de vista práctico su función es la de servir a la investigación de la individualidad en la Medicina Legal. (2)

Estas dos regiones son normalmente examinadas mediante amplificación por PCR y secuenciación, que consiste en la determinación de su secuencia u orden en que se disponen las bases a lo largo de ambos segmentos. Los resultados obtenidos se reflejan como las diferencias encontradas respecto a la secuencia de Anderson. (13)

2.10 Cromosoma Y

El cromosoma Y es el más corto de los cromosomas humanos (60 Mb) y en la especie humana sólo está presente en los varones, por lo que su herencia es paterna. (16)

Diversos marcadores han sido identificados en el cromosoma Y y que pueden ser usados en aplicaciones forenses. Estos marcadores apuntan solo a una fracción masculina biológica. Por lo tanto, esta técnica puede ser muy valiosa si el laboratorio detecta mezclas compuestas (contribuidores masculinos múltiples) dentro de una muestra biológica. Por que el cromosoma Y es transmitido directamente de padres a todos sus hijos, y puede ser usado para trazar las relaciones de parentesco entre varones. (31)

La herencia estrictamente paterna de estos marcadores los hace útiles en la resolución de delitos sexuales, estudios de paternidad y filiación. En los laboratorios de genética forense es muy frecuente encontrar evidencias con mezcla de fluidos corporales de diferentes individuos; allí el análisis del cromosoma Y puede ser útil en la detección específica de la fracción masculina de ADN en muestras compuestas por ADN

masculino y femenino. Esto permite una determinación directa del haplotipo implicado, sin necesidad de realizar una extracción diferencial. (27)

2.11 Genoma nuclear vs mitocondrial

Tabla 2. Características del Genoma nuclear y mitocondrial.

	GENOMA NUCLEAR	G. MITOCONDRIAL
Tamaño	3.000 Mb	16,569 pb
N° de moléculas de ADN diferentes	23 (en XX) ó 24 (en XY), todos lineales	1 de ADN circular
Total de moléculas de ADN/célula	23 en las células haploides	Varios miles
	46 en las células diploides	
Proteínas asociadas	Varias clases de proteínas histónicas y no histónicas	Libre de proteínas
N° de genes	50.000 a 100.000	37
Repetición de ADN	Amplias fracciones	Muy poco
Transcripción	La mayoría de los genes se transcriben individualmente	Transcripción continua de multiplicidad de genes
Intrones	En la mayoría de los genes	Ausentes
% de ADN codificante	2 a 3 %	Aproximadamente 95 %
Recombinación	Al menos una vez por cada par de homólogos en la meiosis	Ninguna
Herencia	Mendeliana, en las secuencias en "X" y en autosomas; paterna, en las secuencias en "Y"	Exclusivamente

Fuente: Strachan, T. The human genome. βios Scientific Publishers, Medical Perspectives Series. Londres. 1994

pb: pares de bases

1 Kb: 1 Kilobase= 1000 pb

1 Mb: 1 Megabase= 1x 10⁶ pb

CAPITULO 3

MÉTODOS DE ESTUDIO

3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Técnica de amplificación Genética

PCR es un método que permite **amplificar, copiar o multiplicar, un trozo o fragmento de ADN determinado**, un número infinito de veces. Con su invento, el científico californiano **Kary Mullis en 1984**, revolucionó el mundo de la investigación genética, y no solo para la ciencia forense. La importancia que tiene para la criminalística la aplicación de PCR es enorme, ya que de indicios mínimos se ha podido obtener una información valiosa para poder identificar a una persona entre todas las demás. (3)

El método de la polimerización en cadena produce millones o miles de millones de copias exactas de una secuencia particular de ADN, es un proceso de amplificación del ADN, y se le refiere a veces como fotocopador molecular. La amplificación de ADN por la polimerización en cadena permite que las muestras biológicas que contienen muy poco ADN, puedan ser analizados para su identificación. La reacción en cadena de la polimerasa (polimerización en cadena) es un método de gran alcance para las amplificaciones enzimáticas in vitro rápidas de las secuencias específicas del ADN (Fig.7). (32)

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las cadenas de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. (3)

La PCR ha realizado el desarrollo de perfiles de ADN de muestras extremadamente pequeñas de evidencias biológicas. La técnica de PCR replica copias exactas de ADN contenida en muestras de evidencias biológicas sin afectar el original. La sensibilidad de la técnica del PCR replica muchas copias de una plantilla de ADN contenidos en una muestra.

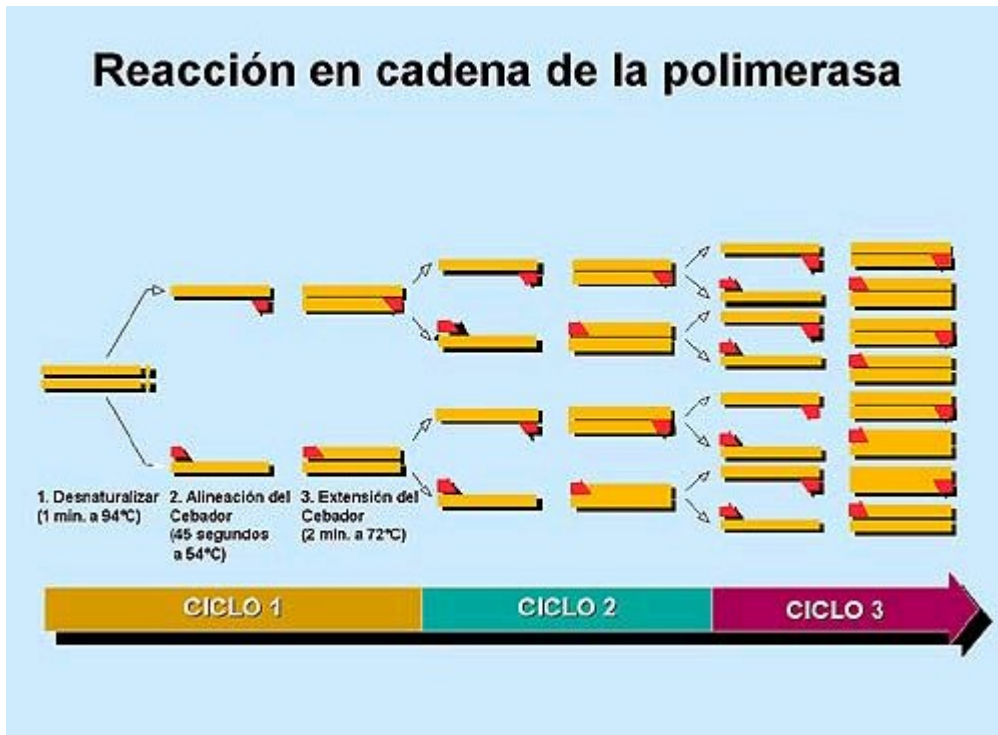


Fig.7. Proceso de replicación de la PCR. Durante cada ciclo. *i*. desnaturalización, *ii*. Alineación del cebador y *iii*. Extensión del cebador

Luego entonces un ciclo de la polimerización en cadena se realiza en tres pasos básicos:

- 1.-En el primer paso llamado **desnaturalización**, el ADN se calienta alrededor a 94°C para separar la doble cadena del ADN, o la secuencia, en dos filamentos.
- 2.-En el paso siguiente **hibridación** (o anillamiento), se baja la temperatura (generalmente a cerca de 60°C) de modo que las cadenas (de una sola fila) que se van a amplificar puedan unirse a cada uno de los segmentos llamados primers por apareamiento complementario.
- 3.- En el tercer paso **elongación** (o extensión), la temperatura se eleva un poco (generalmente a cerca de 72°C) a una temperatura en la cual la enzima ADN polimerasa comienza a agregar nucleótidos por el extremo 3' de cada uno de los cebadores de amplificación, reproduciendo la secuencia de ADN molde. (5)

En la práctica se utilizan 32 ciclos, lo que nos da 1.07 billones de copias de la región que se halla seleccionado con los primers.

La amplificación de ADN por PCR provee de un enorme incremento en la sensibilidad, permitiendo cantidades mínimas de ADN degradado para ser analizado, y nuevas formas de bases para la tipificación de ADN. (3)

3.1.2 Lesiones que bloquean la polimerasa

Algunas lesiones del ADN, habitualmente inducidas por la acción de radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroxilo (OH^-) o el ión superóxido (O_2^-), pueden bloquear la *Taq* polimerasa impidiendo la elongación de las cadenas e inhibiendo, por tanto, la *PCR*. Estos compuestos atacan habitualmente los dobles enlaces de las bases nitrogenadas o de las pentosas del ADN, provocando, en ambos casos, la rotura de los anillos correspondientes. (21)

3.1.3 PCR en tiempo real

En este sistema, la medición de los productos de amplificación se realiza por medio de **detección por fluorescencia**, por medio de un sistema acoplado a las reacciones de amplificación. Este sistema tiene la ventaja de que la incorporación del marcador de la reacción del marcador se puede detectar al tiempo que ocurre (tiempo real), la señal medida es proporcional a la cantidad moléculas producidas, lo que la hace cuantitativa y se realizan varias reacciones de amplificación en un solo tubo, detectando cada una de ellas con un fluorocromo independiente. (33)

Por la naturaleza de la detección de fluorescencia, existe equipo que puede medir en formato de placas multipozos, facilitando así la automatización. (18)

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. (33)

Los equipos para PCR a tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos **cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones**, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

3.2 Tipos de Polimorfismos

Los diferentes tipos de polimorfismos los podemos dividir básicamente en dos categorías: polimorfismo de repetición y polimorfismos de secuencia

3.2.1 Polimorfismos de repetición

Se trata del polimorfismo que se observa más frecuentemente en el ADN repetido en tándem. Es el número de veces que se repite un fragmento de ADN ó unidad de repetición que determina la diferencia entre unos individuos y otros. Según el número de nucleótidos que forman las unidades de repetición de estos fragmentos se distinguen: Desde el punto de vista genético-legal es el ADN repetido en tándem y, dentro de él, el ADN **minisatélite** y **microsatélite** (polimorfismo de repetición más utilizado actualmente). (16)

Una categoría importante de ADN repetitivo, está constituida por el **ADN repetido en tándem**. Está constituido por bloques de ADN con una **secuencia común** de nucleótidos que se repiten uno a continuación de los otros un determinado número de veces. Estas secuencias están distribuidas a lo largo de todo el genoma y su polimorfismo es debido a cambios en el nº de veces que se repite una secuencia núcleo o core. Si dicho núcleo está formado por 2-7 pb estaremos ante un microsatélite o **Polimorfismo STR** (*Short Tandem Repeat*). Si está formado por más de 7 pb estaremos ante un minisatélite o **Polimorfismo VNTR** (*Variable Number of Tandem Repeat*). Esta variación se traduce en diferencias en la longitud de los fragmentos a estudiar. (16)

3.2.1.1 ADN microsatélites (STR)

Análisis STR

Debido a su tamaño se les conoce como Repeticiones Cortas en Tándem, en estos marcadores también se observan variaciones en la secuencia de la repetición. Los STRs constituyen elementos extraordinariamente útiles en la identificación humana y en el mapeo genético debido a su elevado polimorfismo (gran variabilidad entre personas), tasa de mutación relativamente bajas, pequeño tamaño que optimiza su amplificación y ubicación cromosómica establecida. Están conformados por secuencias muy cortas de ADN repetitivo, con unidades de repetición que van entre 2 a 13 pares de bases (pb), se encuentran distribuidos ampliamente en el genoma en bloques de longitud menores a 400 pb. Su tamaño va entre 80 y 550 pb. La aplicación en el campo forense de los polimorfismos en ADN microsatélite comenzó a principios de la década de los noventa. (11)

El análisis STR es un análisis forense que evalúa regiones específicas (loci) que son encontrados en el ADN nuclear. La variable (polimórfica) natural de las regiones STR que son analizadas para pruebas forenses intensifica la discriminación entre un perfil y otro. Por ejemplo, la probabilidad de que alguno de dos individuos (excepto gemelos idénticos) tendrán el mismo perfil de ADN que puede ser tan grande como 1 en 1 billón o más. El propósito de establecer el análisis STR como núcleo central es para asegurar de que todos los laboratorios forenses puedan establecer bases de datos de ADN uniformes y, más importante, compartir información forense valiosa. (34)

STR es un lugar específico de ADN, que contiene segmentos cortos de ADN (generalmente cuatro nucleótidos de largo para Análisis forenses de ADN) que se repite uno tras otro (en tándem) en números de diferenciación a través de la población. Los segmentos STR de ADN no codifican para las proteínas u otras características del fenotipo, y por lo tanto no domina para estos lugares específicos. (7)

Ventajas y desventajas de ADN microsatélites

Los loci microsatélites son los de mayor utilidad hoy en día en el campo de la identificación genética.

Los STR se distribuyen ampliamente por todo el genoma encontrándose tanto en regiones génicas como extragénicas. Los STR situados en regiones extragénicas o no codificantes son los responsables del gran avance de la Genética Forense. Además de su aplicabilidad en dicho campo, estos loci son utilizados en el desarrollo de mapas de ligamento y en el diagnóstico clínico de enfermedades de origen genético.

La utilización de los ADN microsatélite presenta grandes ventajas frente a los sistemas anteriormente mencionados.

La aplicación de la técnica de PCR, permite obtener varios millones de copias de un fragmento determinado de ADN en un tiempo de 2 a 3 horas, permitiendo analizar muestras cuya cantidad de ADN es escasa.

El tamaño de los productos amplificados es pequeño (100-500 pb) de forma que es posible obtener resultados a partir de ADN sumamente degradado cuyos fragmentos son de aproximadamente 1000 pb.

El tiempo necesario para completar los análisis es muy corto, por la técnica empleada, que además es mas sencilla que la utilizada para el ADN minisatélite y con un costo mas reducido.

Los sistemas STRs revelan alelos definidos con precisión, es decir, son variables discretas, esto permite simplificar el análisis estadístico de las frecuencias alélicas en las poblaciones, y por otro lado es mucho mas fácil la estandarización y la comparación de los resultados entre los diferentes laboratorios. (11)

3.2.1.2 ADN minisatélite RFLP

Esta formado por repeticiones de 10 a 65 pb, ricas en G-C, agrupadas en tándem formando bloques relativamente grandes de cientos a miles de repeticiones; esos

bloques se encuentran repartidos en todo el genoma. Las secuencias de ADN minisatélites tienen un tamaño aproximado 0.5 a 40 Kb, con una unidad de repetición entre 14 a 500 pb.

Algunas de estas repeticiones, denominadas ADN minisatélite hipervariable, se caracterizan por su elevado polimorfismo (diferencias en secuencia y número de repeticiones) no sólo entre individuos de una especie, sino incluso entre los dos cromosomas homólogos de un individuo. (11)

RFLP ó Polimorfismos de longitud (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Los RFLP, son el resultado de dividir artificialmente al ADN en trozos o fragmentos para posteriormente poder estudiarlo en el laboratorio. Conocemos que el ADN humano está compuesto por miles de millones de pares de bases que conforman los cromosomas; un ADN así estructurado es imposible de analizar, por que es muy grande para ser manejado en un laboratorio, además de ser poco informativo, por ello se procede a cortarlo en trozos más cortos, lo cual se hace utilizando unas enzimas de restricción o restrictasas tipo II, que son unidades biológicamente activas que poseen todos los seres vivos. Después de cortar específicamente en determinadas secuencias de bases, lo que antes era una cadena aparece después como múltiples trozos de ADN de longitudes diferentes. (35)

En 1985 el Dr. Alec Jeffreys describió por primera vez la técnica de la "huella genética". La tecnología que utilizaba el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción RFLP fue el método inicial empleado en los análisis forenses de ADN y fue adoptado en varios países. Como requiere una elevada cantidad de ADN no degradado, **la tecnología RFLP ya no es el método de elección** en la mayoría de los laboratorios de pruebas forenses del ADN. (28)

3.2.2 Polimorfismos de secuencia. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Sin embargo no debemos perder de vista los **polimorfismos de secuencia**, pues también son útiles en identificación. Un polimorfismo de secuencia se produce cuando en una misma región de ADN puede aparecer una secuencia de bases u otra distinta, sin tener que ver con el número de repeticiones. Este es el caso de la región que codifica para el sistema HLA en el ADN nuclear y de la región control del ADNmt. (16)

Estos polimorfismos se deben a las mutaciones que pueden ser bien sustituciones de nucleótidos, inserciones o deleciones. Como hemos visto en apartados anteriores, si la sustitución consiste en el cambio de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina se denomina transición y si se trata de un cambio de una purina por una pirimidina o una pirimidina por una purina se denomina transversión (tabla 3). En la población caucásica son mucho más frecuentes las transiciones que las transversiones. (16)

Son polimorfismos de posición (cambio de una base) en el ADN genómico en el que un nucleótido tiene una diferente secuencia alternativa, que esta presente en individuos normales en una población dada, y en la cual el alelo más frecuente tiene una abundancia igual o mayor al 1%. La mayoría de variaciones de los SNPs que involucran simples sustituciones de bases, el resto de ellas son inserciones o deleciones. Un SNP se detecta por secuenciación de una región particular de diferentes individuos, quienes pueden ser idénticos (homocigotos: T/T o C/C) o diferentes (heterocigotos T/C) en el mismo sitio polimórfico. (11)

Un SNP puede ser bi., tri o tetralélicos. En el ser humano tan sólo se observan los dialélicos (binarios). Los SNP no son los únicos marcadores bialélicos en el genoma humano. (11)

Se trata de mutaciones puntuales dentro de la secuencia de ADN y suelen ser de tipo bialélico, es decir presentan únicamente dos alelos. Estas mutaciones se clasifican en dos tipos: (1) transiciones, consistentes en el cambio de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina y (2) transversiones, consistentes en el cambio de una purina por una pirimidina o una pirimidina por una purina. (16)

SNP	ALELO	SECUENCIA
EA2	A	CCGCCGCGCTCCCAGCCCCGGCAGCCTCAGCATC A GCGGCGGGCGGGCGGCGTC
	G	CCGCCGCGCTCCCAGCCCCGGCAGCCTCAGCATC G GCGGCGGGCGGGCGGCGTC
CSTB	T	GCCGCCAAGATGATGTGCGGGG T CCCTCCGCCACGCAGCCGGCCACC
	G	GCCGCCAAGATGATGTGCGGGG G CCCTCCGCCACGCAGCCGGCCACC

Tabla 3: Polimorfismos tipo SNP. Transición: EA2 en el cromosoma 19 (NCIB Assay Id: 18419); Transversión: CSTB (Cystatin B) en el cromosoma 21 (NCBI Assay Id: 8005).

El estudio del polimorfismo único de nucleótidos (SNPs) esta tomando mayor importancia en el análisis genético forense. Los lugares geométricos de SNP son extensos y son adaptables al análisis de los pequeños amplicones del ADN, presentando así la posibilidad de mecanografiar al ADN degradado. (36)

3.3 Amelogenina

La amelogenina es una proteína hidrofóbica producida por los ameloblastos durante el desarrollo del esmalte dental.

En el caso de la amelogenina, un fragmento de este gen es uno de los marcadores más utilizados en Biología Forense para el diagnóstico de sexo de origen humano desconocido. Sobre un gel de agarosa en el caso de los varones (XY) se observan dos bandas de ADN, una perteneciente al cromosoma Y de 112 pares de bases de longitud y otra perteneciente al cromosoma X de 106 pares de bases de longitud. Mientras que en las mujeres (XX) solo aparece la banda de 106 pares de bases de longitud. (16)

3.4 Microchips

La considerable reserva del estudio de antecedentes que requiere análisis de ADN en los laboratorios del crimen existe hoy en parte debido a deficiencias en mano de obra y avances tecnológicos.

Las técnicas de microfabricación desde hace aproximadamente 2 décadas han revolucionado la industria del circuito integrado trayendo computadoras más rápidas y de mas grande alcance. Estos métodos de microfabricacion ahora se están aplicando en nuestra área para convertirse en laboratorios miniatura, microchip (es una electroforesis capilar en “miniatura”) o chip genético. La miniaturización de los pasos para la preparación y el análisis de la muestra en los marcadores forenses del ADN, podría llevar a los dispositivos que permiten la investigación de la evidencia biológica en la escena del crimen a un análisis más rápido y menos costoso del ADN. (Fig. 8). (37)

Los directores del laboratorio de ciencia forense a menudo critican los requisitos de tiempo y costo para estos análisis, particularmente en los kits para material de evidencia de violación. El tiempo requerido para el análisis del ADN tanto del sospechoso como de la victima, con los kits para violación con métodos convencionales (el tiempo que pasa va de horas a días para un solo caso) a comenzado a reducirse con avances en la tecnología del **microchip**. La tecnología de *Microdevice* tiene el potencial para apresurar la incógnita molecular y sustituye muchas de las técnicas convencionales actualmente usadas; son placas miniatura en la cual se imprimen hasta 400,000 secuencias de ADN diferentes y son inmovilizadas por técnicas fotolitográficas (en donde 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. Los **biochips** surgen como consecuencia de una combinación entre técnicas microelectrónicas empleadas para la fabricación de microprocesadores informáticos y materiales biológicos Además de que ofrecen una reducción en el volumen de muestra pueden ser una vía más rápida para su análisis. (38)

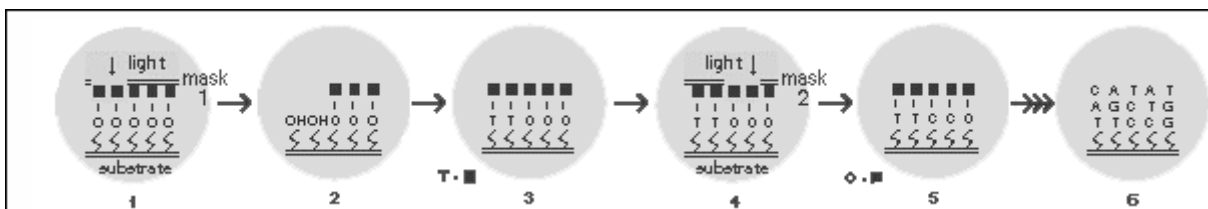


Fig. 8. Cada “casilla” del chip posee una cadena de un oligonucleótido de manera que solamente aquel fragmento de ADN que hibride perfectamente con ella permanecerá unido tras los diversos lavados.

3.5 Práctica forense

Es fundamental hacer referencia a cómo se utilizan todos los conocimientos y técnicas descritas en la rutina de los laboratorios forenses apuntar y explicar por qué se elige un tipo de análisis y no otro. Las muestras forenses de referencia *indubitadas* (de procedencia conocida, es decir, sabemos quien pertenecen) de individuos vivos (víctimas o sospechosos) no dan problemas a la hora de realizar el análisis genético bien se trate de sangre, saliva, pelos arrancados etc., y cualquiera de los métodos de extracción de ADN descritos en la bibliografía puede ser válido para obtener un resultado exitoso. Sin embargo, las evidencias con carácter *dubitado* (muestras de procedencia desconocida, sin identificar) que aparecen en el lugar de los hechos pueden sufrir una serie de modificaciones que dependerán no sólo de las condiciones ambientales a las cuales se vean sometidas, sino del tiempo transcurrido, de la cantidad de muestra, del soporte en el cual se encuentran, del lugar de donde procede y del tipo de muestra biológica. El número de factores distintos que acompañan a cada muestra hace que muchas veces resulte realmente difícil estandarizar el tratamiento que “a priori” se ha de dar a cada muestra. Ya que es imposible reproducir en el laboratorio todos los factores que pueden intervenir desde el momento en que se produce el delito y por ello sólo si **el analista posee la suficiente experiencia y rigurosidad estará garantizado el éxito en el estudio.** (16)

Como se menciono anteriormente para determinar a qué individuo pertenece una muestra biológica se recurre al estudio de parte de su ADN y para poder analizarla, previamente hay que aislarla separándola del resto de componentes celulares. A pesar de que en una primera fase se aísla la molécula completa, posteriormente sólo se estudian ciertas regiones de ella, concretamente las zonas más polimórficas («marcadores», o «loci»). El análisis de ADN se realiza en cuatro fases básicamente.

3.5.1 Extracción del ADN

El ADN puede obtenerse a partir de cualquier célula nucleada de nuestro organismo. Pocos microgramos (μg) de ADN son suficientes para realizar un análisis genotípico. Una célula contiene aproximadamente 5 picogramos (pg) de ADN.

Los métodos de obtención de los ácidos nucleicos son muy sencillos, aunque laboriosos. La principal preocupación en la obtención del ADN es evitar la degradación producida por las enzimas liberadas por las células una vez lisadas. (8)

Los procedimientos de extracción de ADN de cabello fluidos corporales, tejido, y tejido calcificado (dientes y huesos) o de donde sea posible obtener una porción de la muestra se debe realizar en campanas de flujo laminar. (39)

Conocemos ya que el ADN se encuentra en el interior de los núcleos celulares. El primer paso para proceder a analizarlo es sacarlo o extraerlo.

Existen diversos procedimientos de extracción, que deben cumplir con la doble misión de extraer y purificar el ADN. Independientemente de técnicas particulares de algún laboratorio, José Antonio Lorente Acosta señala dos de los métodos más usados:

1.-Extracción Orgánica: compuesta por una mezcla básicamente de fenol y cloroformo con iso-amil-alcohol y posterior precipitación (acumulación del ADN libre en el cloroformo en un punto determinado) del material genético con el etanol o por filtración con unos microfiltros de tipo Centricon o Microcon.

2.- Extracción con Chelex: el chelex es una resina iónica captadora de iones, muy útil en la ciencia forense porque en concentraciones del 5% es capaz de depurar lo suficientemente la gran mayoría de las muestras, dejándolas aptas para su estudio posterior, especialmente útil en casos de amplificación con PCR (40)

3.5.2. Cuantificación

El ADN puede separarse según el tamaño de los fragmentos que se obtienen tras la digestión con enzimas de restricción. Esta separación se realiza sometiendo al ADN a una **electroforesis en un gel de agarosa** o poliacrilamida, que permite la migración de los fragmentos de ADN en función del tamaño y de la carga eléctrica. Los geles de agarosa resuelven fragmentos de entre 30 kilobases (kb) y unos 100 pares de bases (pb), mientras que los geles de poliacrilamida ofrecen separaciones de fragmentos menores, entre 1.500 y 1 pb, según sean las concentraciones empleadas. (8)

Una vez extraído y purificado el ADN es conveniente cuantificarlo a groso modo mediante minigel de agarosa para observar el estado de degradación y posteriormente de forma más fina mediante hibridación con sonda. Llama la atención las diferencias que a veces existen entre las cuantificaciones realizadas con ambos métodos. Esto se debe a dos motivos principalmente. Por un lado la cuantificación en minigel es una técnica de cuantificación aproximada y de menor sensibilidad, lo cual hace que se produzcan fácilmente errores debidos a las variaciones de las condiciones de un experimento a otro o incluso errores en la lectura por parte del operador. Por otro lado, en los minigeles de agarosa se cuantifica ADN total (humano y no humano) y no debemos olvidar que muchas de las muestras analizadas pueden contener ADN bacteriano o fúngico debido al estado de descomposición en que se encuentran.

También hemos de apuntar que existen muestras especiales en las que presumimos que son restos biológicos humanos por las circunstancias del caso y que resultan negativas en la cuantificación de ADN humano. En ellas nos puede quedar la duda de que la muestra contenga cantidades de ADN menores a las detectables con los métodos de cuantificación y por ello puede forzarse la amplificación de algún marcador para comprobar que efectivamente el extracto estaba libre de ADN totalmente. (16)

3.5.3 Amplificación

Después de una extracción de ADN en muestras que se encuentran en muy mal estado de conservación, se obtienen fragmentos de sólo 100-200 pares de bases debido a su estado de degradación, con el agravante de que muchas veces estas muestras van acompañadas de ADN bacteriano. Por el contrario las muestras de tejido fresco proporcionan fragmentos de ADN de más de 10,000 pares de bases.

La amplificación de ADN, por PCR consiste en copiar muchas veces el fragmento concreto de ADN que queremos estudiar para obtener una cantidad adecuada que nos permita su detección, gracias a esto podemos analizar pequeñas cantidades de muestra biológica. Normalmente se amplifican varios fragmentos de ADN en paralelo para evitar agotar la muestra y para conseguir una mayor rapidez en el análisis (PCR Multiplex).

De todos los polimorfismos nucleares, los más discriminativos son los del tipo minisatélite pero presentan el problema de que se requiere una alta calidad en el ADN que va a ser estudiado debido a su gran tamaño. Como hemos apuntado, en muestras forenses lo habitual es encontrarnos con ADN degradado y resultará de gran dificultad el análisis de este tipo de marcadores. Por ello se recurre al estudio de polimorfismos del tipo *microsatélite* que si bien son menos informativos que los anteriores, con el estudio de una batería de los mismos se consigue un poder de discriminación más que aceptable para identificar muestras problema. Pero existen situaciones en las que es recomendable el análisis de otros tipos de polimorfismos como son los polimorfismos de ADN mitocondrial y polimorfismos ligados al cromosoma Y .

3.5.4 Secuenciación

Detección del producto amplificado o tipaje: esta es la fase final del análisis molecular y es la que nos permite caracterizar y clasificar los fragmentos de ADN estudiados en cada muestra para diferenciar unas de otras.

Dado un fragmento determinado, al secuenciarlo se pretende conocer la disposición u orden en que se encuentran los nucleótidos que lo componen. La mayoría de las técnicas utilizadas en la actualidad en ciencia forense se basan en el denominado "método de la inhibición de la terminación" o método de Sanger, por "**cycle-sequencing**", especialmente útil para secuenciar muestras muy poco concentradas. La técnica consiste en realizar una PCR convencional del fragmento de ADN.

3.5.4.1 Minisequenciación fluorescente en fase sólida.

La utilidad de este método consiste en la detección de cambios en la secuencia de ADN que suponen la sustitución de una sola base o pequeñas inserciones o deleciones. Originalmente fue diseñado con metodología de detección no fluorescente pero el crecimiento de las tecnologías de secuenciación automática ha permitido aumentar la sensibilidad de la técnica mediante el marcaje fluorescente. Por ello, hoy en día puede aplicarse al estudio de muestras de índole forense para analizar polimorfismos tipo SNP

y como herramienta de screening para diferenciar mitotipos antes de secuenciar completamente el d-loop mitocondrial. La técnica comprende dos fases, una de amplificación y otra de secuenciación. (18)

3.6 Heteroplasmia

En el genoma mitocondrial puede darse el fenómeno de heteroplasmia, consistente en la existencia de distintas secuencias o variantes dentro de una misma célula, o en células distantes de un mismo individuo. (10)

En la identificación genética de cadáveres a través de familiares maternos podemos encontrarnos con relativa frecuencia que las secuencias mitocondriales de unos y otros pueden ser diferentes debido a heteroplasmia en el linaje, por lo que hemos de tener esto muy en cuenta para evitar una falsa exclusión, por ejemplo observando cuidadosamente la secuencia de todas las muestras para detectar bajos niveles de heteroplasmia que indicarían la segregación de las variantes de ADNmt dentro del linaje.

3.7 Contaminación

El gran enemigo que afrontan los laboratorios que practican análisis genéticos con fines forenses se llama contaminación. La aparición de material genético exógeno al propio de la evidencia ocasiona resultados no interpretables y en algunos casos absolutamente erróneos. Esta circunstancia se agudiza especialmente en aquellas muestras en las que la cantidad de ADN presente es muy escasa. Es por tanto muy importante seguir las medidas orientadas a minimizar la contaminación. (19)

Como se menciono anteriormente una de las limitaciones de los análisis de ADN es la contaminación biológica humana. La preservación del indicio biológico de la contaminación de ADN exógeno desde el momento de recoger la muestra y durante el análisis en el laboratorio cobra vital importancia cuando se trabaja con sistemas de análisis tan sensibles y en especial cuando se trabaja con indicios biológicos con bajo

contenido en ADN. Los laboratorios forenses se ven por tanto obligados, además de desarrollar medidas para evitar al máximo la posibilidad de una contaminación, a analizar de forma sistemática una serie de **controles negativos y positivos** para monitorear la posible influencia de la contaminación durante el análisis de cada muestra pericial. (41)

Por lo que, una práctica esencial para codificar el ADN mitocondrial es reducir al mínimo y supervisar la contaminación dentro del laboratorio. Debido a la sensibilidad de detección con análisis de ADNmt, ya que en ocasiones se llegan a detectar niveles mínimos de contaminación exógena. Sin embargo, se pueden obtener resultados confiables utilizando medidas apropiadas de control de calidad. La contaminación debe ser supervisada, y cada laboratorio debe tener un método para definir y cuantificar la contaminación. Los laboratorios deben determinar el umbral máximo permitido para la contaminación con estudios internos de la validación. El laboratorio deberá tener procedimientos de funcionamiento estándar en cada área para evitar la contaminación. Cada laboratorio debe establecer los criterios de la evaluación para los controles, incluyendo un control positivo, un control negativo y un blanco de reactivos. (40)

Para tratar de *minimizar la contaminación* introducida por traspaso directo de material genético desde el manipulador (arqueólogos, conservadores de museos, investigadores) a la muestra se emplean comúnmente un *conjunto de medidas*:

- Uso de ropa protectora: bata de laboratorio, guantes de látex o similar, mascarilla y redecilla para el cabello.
- Eliminación de la capa superficial de la muestra antes de proceder a la extracción de su material genético.
- Realización de las extracciones y amplificaciones en el interior de una campana de flujo laminar. (21)

Algunos de los procedimientos para la *detección de la contaminación* son:

- El uso de controles negativos que contienen todos los reactivos excepto la muestra, y que se procesan en paralelo a las muestras.

- La caracterización genética, para el marcador y fragmento que se desea estudiar, de todo el personal que haya tenido contacto con la muestra en algún momento.
- La realización de extracciones múltiples a partir de un mismo extracto, de diferentes extractos de una misma muestra, y/o de extractos de diferentes partes del organismo.
- La replicación del experimento en un laboratorio independiente por personal diferente. (21)

La presencia de suciedad, grasa, impurezas y otros contaminantes inhiben la amplificación del ADN de la muestra durante la PCR, por ende **a mayor contaminación mayor grado de dificultad en la obtención de los resultados finales.** (43)

Existen muestras que “a priori” es difícil determinar si contendrán suficiente cantidad de ADN nuclear para su estudio (algunos restos óseos, pelos en estado catagénico). En estos casos es recomendable realizar la extracción de ADN encaminada a un posible estudio de ADNmt desde el principio, es decir, en un lugar específico de extracción, con reactivos y pipetas de uso exclusivo, etc., para evitar posibles contaminaciones como ya hemos descrito anteriormente. Una vez extraído el ADN se toma una alícuota del mismo para intentar una analítica mediante ADN nuclear y si ésta resulta negativa se pasa a realizar el estudio de los polimorfismos mitocondriales. (16)

En algunos casos forenses las mezclas de ADN a partir de dos o más individuos es común y se debe tener cuidado en la interpretación del ADN. En la evaluación de la evidencia, un analista debe decidir si la fuente del ADN dentro de la muestra investigada corresponde a un solo individuo o más de una persona. Esto se detecta con el análisis del número de alelos observados en cada marcador así como los cocientes de altura del pico e intensidad en la coloración del gel (electroforesis). En algunas ocasiones ocurren picos adicionales que no se deben confundir con los alelos verdaderos. (37)

3.8 Validación de STR en el análisis de ADNmt

La Validación se refiere al proceso de demostrar que un procedimiento de laboratorio es **robusto, fiable y reproducible** en las manos del personal que realiza la prueba dentro del laboratorio.

Se consideran en general dos etapas: **validación de desarrollo y validación interna**. Validación de desarrollo implica la experimentación de nuevos loci STR o kits, los nuevos conjuntos de primer, y las nuevas tecnologías para la detección de alelos STR; es generalmente realizada por fabricantes de Kit. comercial STR y laboratorios grandes, como el Laboratorio del FBI. Validación interna, por otro lado, implica verificar que los procedimientos establecidos, previamente examinados en el marco del examen de validación de desarrollo (a menudo por otro laboratorio) trabajará de manera efectiva en el propio laboratorio, esta es la principal forma de validación realizada en laboratorios forenses de ADN establecidos en locales pequeños y estatales. (44)

Cada laboratorio forense elabora o prueba los protocolos normalizados de trabajo (PNT) que dan un listado detallado de todos los materiales necesarios para llevar a cabo un ensayo, así como los pasos exactos necesarios para llevar a cabo el experimento. Además, la lista de los PNT aspectos críticos del ensayo que deban ser monitoreados cuidadosamente. (37)

La interpretación de la secuencia mitocondrial del ADN es una cuestión de juicio y experiencia profesional. Aún cuando haya protocolos generales para el análisis de ADNmt, no todos los casos se deben ejecutar bajo estas reglas. Es importante que cada laboratorio escriba y desarrolle las normas para la interpretación de resultados analíticos. Estas pautas de la interpretación se deben basar en los estudios de la validación llevados a cabo según los estándares de la garantía de calidad para las pruebas forense del ADN del delincuente condenado.

Los laboratorios forenses y las bases de datos sobre ADN de cualquier país deben estar acreditados o cumplir normas como las de la Guía ISO/IEC 17025 de la nueva Organización Internacional de Normalización (que apareciera en 2002). (28)

En México el **laboratorio de Genética Forense** de Servicios Periciales de la PGR (Procuraduría General de la República) cuenta con las características de funcionalidad, espacio, ventilación, iluminación, comodidad y seguridad en su laboratorio, dando paso a los trámites de certificación de técnicas, equipos y personal bajo la norma internacional ISO-9002 en Servicios Periciales. (2)

Los métodos en genéticas forenses deben superar varios obstáculos antes de ser aplicada al estudio de casos penales. Primero, las técnicas se deben adaptar al trabajo sobre las muestras que no siempre son adecuadas y se limitan a menudo en cantidad. En segundo lugar, se requiere de una validación para demostrar robustez del método, para pasar la prueba de la admisibilidad ante una corte (los criterios y la legislación de la admisibilidad diferencian entre los países e incluso entre estados aun en los Estados Unidos). Finalmente, los sistemas de gestión de la calidad una vez ejecutados deberán cubrir con la acreditación externa de laboratorios forenses internacionales, los estándares reconocidos (tales como ISO17025) son un requisito previo; debido a esto el adaptar nuevos progresos técnicos puede ser a veces lento. (3)

En México la aplicación de esta prueba forense y de muchas otras, son aun poco empleadas, quizá tenga que ver con la poca disponibilidad o escasez permanente de recursos económicos destinados para este fin, además de la falta de voluntad y capacidad de las autoridades encargadas de la toma de decisiones y la poca acción ciudadana. (2)

3.9 Presentación de las pruebas

Para que un análisis forense sea admitido como prueba, ha de cumplir tres condiciones primero, que la teoría científica en cuestión sea validada por la comunidad científica; segundo, la fiabilidad de la prueba debe ser reconocida; tercero, debe demostrarse que ésta se aplico adecuadamente en el caso concreto. En Estados Unidos se ha utilizado la prueba de ADN en más de 1000 casos criminales, pero solo en algunos casos se ha cuestionado en audiencias procesales. El poder de la identificación forense por ADN 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. (45)

Los diferentes tipos de muestras biológicas pueden ser utilizadas para excluir un individuo de su participación en un crimen. En particular, la transferencia directa de ADN de un individuo a otro ó a un objeto (ley de correspondencia) puede ser usada para relacionar a un sospechoso con el lugar de los hechos.

La recolección de evidencia de ADN en el lugar de los hechos debe ser realizada cuidadosamente, y debe cuidarse también la cadena de custodia con el fin de producir perfiles de ADN que sean significativos y legalmente aceptados en el juzgado. Las técnicas de ADN se han transformado en técnicas altamente sensibles que incluso aquellas muestras tan pequeñas que no puedan ser observadas a simple vista, pueden ser utilizadas para relacionar al probable responsable con el lugar de los hechos. **La evidencia debe ser recolectada, preservada, almacenada y transportada cuidadosamente al laboratorio de ADN.** (1)

Se ha discutido mucho sobre cómo explicar el valor de la prueba en el informe forense cuando el perfil del ADN acusatorio coincide con el del ADN del sospechoso. Para evaluar el valor probatorio, los expertos tienen que calcular la frecuencia con la que se presenta el perfil de ADN obtenido y la probabilidad de que el perfil del ADN utilizado como prueba coincida con el de una persona inocente elegida al azar.(28)

Para producir los perfiles de ADN se analizan loci heredados. La frecuencia de un perfil de ADN en una población elegida al azar se calcula mediante *reglas estadísticas bayesianas*. Hablando en términos generales, cuando el perfil del ADN de una mancha presentada como prueba acusatoria coincide con el de un sospechoso en un gran número de loci, hay razones de peso para suponer que las dos muestras analizadas provengan de la misma persona. (28)

El juez tiene entre sus funciones la de establecer la *validez y la pertinencia* de una prueba. En la práctica, prueba es sinónimo de ensayo, de experimentación, de revisión, realizados con el propósito de establecer la certeza de una afirmación. En general el gran reto de la prueba en Genética Forense es la correcta valoración de la prueba, su correcta comunicación a los tribunales y el correcto entendimiento por estos del significado de la **probabilidad** y de las **razones de verosimilitud**. La Razón de verosimilitud es el valor de la probabilidad de que un material genético proceda de un individuo determinado en comparación con el resto de la población de referencia. (43)

El éxito de la obtención de los perfiles en tejidos de cadáveres depende del grado de preservación de ADN. Cuando las muestras de tejidos son muy antiguas la probabilidad de éxito es mayor si se trabaja con el sistema de ADNmt. (22)

En otras palabras, si las muestras que se van a utilizar para obtener los perfiles polimórficos propios de cada individuo son recientes o han sido conservados apropiadamente, el sistema CODIS (Combined DNA Index System) dará resultados. Casos en los cuales el ADNmt que es menos susceptible a las modificaciones químicas físicas mencionadas anteriormente que además de caracterizarse por presentar una región con elevado índice de mutación (región hipervariable), hace que este sistema sea de utilidad, principalmente en los casos de material ampliamente degradado. (22)

Probabilidad de Coincidencia al Azar (PCA)

La probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la misma población del sospechoso tengan el mismo patrón genético (PCA), es el principal problema y el punto de controversia en los casos legales. El grado de certeza de un método de identificación de individuos depende de la PCA; a menor PCA, mayor será la certeza. En el caso de crímenes y violaciones, el valor de la PCA para un marcador dado depende de la frecuencia alélica de los dos alelos que conforman el genotipo y se expresa con la siguiente:

PCA= q^2 para homocigotos y

PCA= $2pq$ genotipos heterocigotos

donde p y q son las frecuencias de los alelos q y p en la población. (35)

En la actualidad, las aplicaciones forenses en el análisis del ADN se realizan con PCR y STRs distribuidas a través del genoma; pues estas regiones son independientes y el número de repeticiones varía entre uno y otro individuo, por lo que la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo perfil disminuye con el número de marcadores investigados. Si el análisis en el STR de un sospechoso demuestra que es diferente al perfil de la evidencia, esa persona puede ser eliminada de la investigación

inmediatamente. Pero si no, el científico forense debe calcular la probabilidad de que otra persona al azar pudiera tener un perfil genético idéntico, utilizando las reglas de genética de población y estadística simple. Utilizando la frecuencia dentro de la población en general de cada alelo encontrado en el ADN del sospechoso, con la ecuación de **Hardy-Weinberg** la cual determina la probabilidad de que una persona seleccionada aleatoriamente comparta ese mismo genotipo para ese marcador en particular. (46)

La degradación puede dar lugar a la reducción en la cantidad de ADN que este disponible para el análisis y en algunos casos son indetectables. (46)

3.10 La base de datos

Una de las características culturales del hombre es su capacidad de recolectar información, procesarla y difundirla. La memoria social es la base del desarrollo de la sistematización de la información que ha permitido los grandes cambios sociales en la historia de la humanidad. Actualmente gran cantidad de pensamientos innovadores, hallazgos experimentales y trabajos de creación son capturados y diseminados de manera instantánea mediante computadores en red. Las bibliotecas de información biológica ahora son parte integral para la investigación biológica.

En 1979 un grupo de biólogos y matemáticos se reunió en la Universidad Rockefeller en New York y propusieron la creación de un banco de datos para almacenar secuencias de ADN, nació **la primera base de datos** de secuencias de ADN. (47)

La selección del conjunto de loci utilizado en los análisis de ADN determina el perfil obtenido. Por consiguiente, a fin de facilitar el intercambio internacional de perfiles de ADN, es necesario que se utilice un número mínimo de loci (el conjunto básico de loci) en todos los laboratorios forenses. (28)

Actualmente se estudia un número suficiente de marcadores para distinguir unas muestras de otras. La mayoría de laboratorios forenses utilizan los mismos marcadores con el fin de intercambiar datos sin tener que reanalizar las muestras. (13)

La investigación criminal internacional exige que los aspectos cualitativos de la investigación del ADN sean idénticos en los diversos países con el fin de intercambiar resultados comparables. Las bases de datos nacionales tienen que fundarse en la utilización de loci del ADN normalizados y de un control de la calidad y un sistema de garantía de la calidad internacionalmente reconocida. (28)

Los departamentos de Policía en los Estados Unidos tienen actualmente un aproximado de 500,000 hisopados sin procesar tomadas de víctimas de violación. La mayoría de estos casos sin ningún sospechoso y por ende sin el perfil del ADN de estos. El problema de esta reserva de la agresión sexual es debido en parte al proceso en donde se requiere de mucho trabajo para aislar el ADN de los espermatozoides. (48)

El uso de las pruebas de ADN se empieza a aplicar en México a fines del gobierno de Ernesto Zedillo, en 1999 en la Procuraduría General de la República (PGR). En el caso de Servicios Periciales de la PGR cuenta con 16 especialidades, entre ellos el laboratorio de *Genética Forense*, donde se emplean las técnicas de punta para identificar a las personas a través del Genoma Humano (ADN) y un banco de datos conocido como “CODIS” utilizado en Europa y en Estados Unidos. (2)

CODIS (*Combined DNA Index System* ó sistema combinado de índice de ADN)

El **FBI** (*Federal Bureau of Investigation* u Oficina Federal de Investigación de los Estados Unidos) ha sido un líder en el desarrollo de tecnología de tipificación de ADN para su uso en la identificación de autores de delitos violentos. En 1997, el FBI anunció la selección de 13 loci STR (tabla 4) que formarían el núcleo central de la base de datos nacional de los EE.UU., llamada **CODIS**. Todos los STR del CODIS son secuencias repetitivas tetraméricas. Todos los laboratorios forenses o criminalísticos que usan el sistema CODIS pueden contribuir a una base de datos nacional. Los analistas de ADN, pueden también buscar coincidencias entre el perfil de ADN de pruebas obtenidas en la escena de un crimen y los perfiles de ADN ya disponibles en la base de datos. (43)

Locus	D3S1358	vWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818
Genotipo	15	16	19	12	29	12	11
	18	16	24	13	31	13	13
Frecuencia	8,2%	4,4%	1,7%	9,9%	2,3%	4,3%	13%

Locus	D13S317	D7S820	D16S539	THO1	TPOX	CSF1PO	AMEL
Genotipo	11	10	11	9	8	11	X
	11	10	11	9,3	8	11	Y
Frecuencia	1,2%	6,3%	9,5%	9,6%	3,52%	7,2%	(varón)

Tabla 4. Ejemplo de una muestra para los 13 marcadores y Amelogenina utilizados en el Sistema CODIS

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los avances en el campo de la genética forense han repercutido favorablemente en el área de la criminalística forense y de la identificación humana. En las dos últimas décadas el impacto que ha tenido el análisis de perfiles genéticos ha dado un giro extraordinario en casos criminales, en particular con la determinación de ADNmt se han retomado casos viejos que hasta entonces no se habían resuelto por la carencia de ADN nuclear, se han analizado restos de cadáveres encontrados años después de desaparecida la víctima cotejando el ADNmt de las muestras halladas en el lugar del hallazgo con el ADNmt de objetos personales o con el de familiares vía materna; de igual manera en casos de desastres masivos en donde se analizan restos muy degradados, quemados o en mínima cantidad.

Los avances tecnológicos continuamente aportan mejoras en los métodos y técnicas de análisis de ADNmt. Dado que en las dos últimas décadas se han podido esclarecer numerosos delitos ante un juzgado excluyendo con un alto grado de certeza a personas inocentes. Puesto que al existir una alta variabilidad en los marcadores se pueden concluir con un alto grado de exactitud y confiabilidad que una muestra corresponde a un individuo en particular; razón por la cual se puede ubicar a una persona en la escena del delito si su perfil genético corresponde.

Aún cuando se ha optimizado el tiempo de proceso y existen kits comerciales que disminuyen el costo y requieren muestras mínimas, en un futuro se espera que se llegue a realizar este análisis de manera más práctica y rápida; a pesar de que los marcadores inicialmente utilizados como los RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) se han venido sustituyendo por VNTR (repeticiones en tandem de número variable) y posteriormente por microsatélites STR (repeticiones cortas en serie) que requieren de menor cantidad de muestra así como de tiempo, razón por la cual es el método de elección en la actualidad junto con la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real que al mismo tiempo de estar replicando permite estar monitoreando o detectar al ADN en proceso. Como hemos visto generalmente las muestras forenses no llegan en cantidades y condiciones favorables para ser analizables por cualquier método; en este sentido se siguen buscando nuevos y mejores procedimientos con

mejores posibilidades y que nos brinden un mejor resultado, de aquí surgen los marcadores SNP (polimorfismos nucleotídicos únicos), que son fragmentos mucho más cortos, se localizan fuera de regiones codificantes, tienen una tasa de mutación menor a la de las secuencias repetitivas, se pueden aplicar tecnologías con alto poder de automatización, además de ser muy útiles en muestras sumamente degradadas, y se puede hacer la detección en el cromosoma Y o el ADNmt.

CONCLUSIONES:

Hemos visto que conforme avanzan los conocimientos las técnicas se van modificando continuamente y se sustituyen unas por otras.

Las herramientas con las que cuenta el químico para determinar el análisis del ADNmt no siempre son las adecuadas, pero en general son satisfactorias, dado que están sometidas a las condiciones en la que se reciben las muestras y a los recursos económicos que casi siempre son insuficientes

La situación de nuestro país en esta área es precaria, puesto que la aplicación en México de la prueba de análisis de los polimorfismos del ADN en la medicina forense es aún muy limitada, puesto que aproximadamente hace apenas una década se empezó a introducir en la PGR, en contraste con países con una economía más limitada que la de México, como por ejemplo Argentina y Colombia en donde su uso se ha generalizado

Para poder aplicar el uso de esta tecnología en nuestro país, se tendría que partir desde la legislación en el senado, para poder encausar los recursos mínimos necesarios, tanto económicos (ya que a pesar de ser una tecnología costosa es necesaria para poder retomar algunos casos viejos y guardados en archivos), como de capacitación al personal asignado a estas áreas y así de esta manera dar el auge que requiere esta importante herramienta en la química forense.

Podemos decir finalmente que el análisis de ADNmt promete ser una prueba contundente ante un juicio para casos en los que los vestigios biológicos se encuentran en ínfima cantidad o muy deteriorados por el medio ambiente, y en casos de atentados o desastres masivos. Luego entonces se puede decir que no esta muy lejano el día en que sea posible identificar a un individuo con la certeza científica del análisis del ADNmt y sin que existista la menor duda de la inclusión en el dictamen.

ANEXOS

GLOSARIO

ADN mitocondrial: ADN circular que se encuentra en el interior de las mitocondrias, orgánulo celular responsable de la obtención de energía, en un número de copias que oscila entre 1 000-10 000 y cuyo tamaño es de 16 569 pares de bases.

ADN molde: ADN del que se pretende obtener múltiples copias de un determinado segmento y que, en una reacción de PCR, la polimerasa usa como referencia para la síntesis de las nuevas cadenas de ADN.

ADN nuclear: ADN que se encuentra en el interior del núcleo celular formando parte de los cromosomas y que está presente en todas las células humanas, excepto en los eritrocitos que carecen de núcleo.

Alelo: cada una de las variantes que pueden estar presentes en un locus determinado.

Cebador: fragmento corto de ADN de cadena simple que ligado a la cadena de ADN complementaria permite a la polimerasa extender una nueva cadena de ADN para producir una molécula doble. En una reacción de PCR, se usa un par de cebadores que flanqueen un segmento determinado de ADN para obtener numerosas copias de dicho segmento.

Cromosoma: estructura muy compacta que en humanos está constituida por ADN y proteínas. En una célula somática humana existen 46 cromosomas (23 pares) mientras que en los gametos hay 23 cromosomas. Se clasifican en: sexual: cada uno de los dos cromosomas (X e Y) cuya combinación determina el sexo del individuo, femenino si la combinación es XX y masculino si es XY. Autosómico; cada uno de los cromosomas perteneciente a los 22 pares restantes.

Delección: mutación que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN.

Desnaturalización: separación de las dos cadenas complementarias de una molécula de ADN mediante elevación de la temperatura o exposición a agentes químicos como la formamida o urea.

Diploide: estado en el que una célula posee doble dotación cromosómica, formada por parejas de cromosomas homólogos. Las células somáticas humanas son diploides.

Electroforesis: técnica que permite la separación de moléculas de distinto tamaño cargadas en una matriz mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Enzima de restricción: enzima que funciona como una «tijera molecular» cortando el ADN de forma específica en determinada secuencia que ha reconocido previamente.

Exclusión: proceso mediante el cual se descarta como culpable a un sospechoso.

Gen: segmento de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o de un ARN (ácido ribonucleico). El número total de genes en el genoma humano se estima en unos 30 000.

Genoma: contenido total de ADN en una célula. El genoma humano tiene un tamaño aproximado de 3 000 millones de pares de bases.

Genotipo: combinación alélica en un locus determinado.

Haploide: estado en el que una célula posee una única dotación cromosómica. Los gametos (óvulo y espermatozoide) son haploides.

Haplotipo: combinación de genotipos de diferentes loci que se heredan en bloque. Se habla de haplotipo cuando nos referimos a regiones de ADN o cromosomas que no están sujetos a recombinación, como el cromosoma Y (de herencia paterna) o el ADN mitocondrial (de herencia materna).

Heterocigoto: individuo que para un locus determinado presenta en el cromosoma paterno un alelo distinto al presente en el cromosoma materno.

Heteroplasmia: fenómeno por el que en un mismo individuo pueden coexistir moléculas de ADN mitocondrial que presentan alguna diferencia puntual entre ellas.

Hibridación: proceso por el que dos cadenas de ADN complementarias permanecen unidas atendiendo a unas reglas fijas: la A de una cadena siempre se aparea con la T en la cadena complementaria (mediante dos puentes de hidrógeno) y la C siempre se aparea con la G (mediante tres puentes de hidrógeno).

Homocigoto: individuo que para un locus determinado presenta en ambos cromosomas homólogos el mismo alelo.

Huella genética: patrón de bandas resultante de un análisis de RFLP y que es característico de cada individuo.

Inclusión: comprobar por medio de las ciencias forenses la participación de un sospechoso en un delito, identificación de una persona o paternidad responsable.

Locus: posición que ocupa una determinada secuencia de ADN en el cromosoma.

Marcador genético: segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma.

Meiosis: proceso de división de una célula durante la formación de los gametos en especies de reproducción sexual, mediante la cual una célula germinal diploide da lugar a cuatro gametos haploides, es decir cada una de ellas posee un único miembro de cada par de cromosomas homólogos. Es característico de la gametogénesis.

Mitosis: proceso de división celular cuyo resultado son dos células hijas genéticamente idénticas entre ellas y, a su vez, a la célula madre. Se da en las células somáticas humanas.

Múltiple: reacción de PCR en la que, mediante la adición de varios pares de cebadores en la mezcla, se amplifican simultáneamente varios fragmentos de ADN.

Mutación: cambio o alteración estructural en el ADN que puede consistir en la sustitución de una base por otra o en la delección, inserción o traslocación de un fragmento de ADN.

Nucleótido: unidad química de la molécula de ADN de cadena simple constituida por un azúcar, un fosfato y una base nitrogenada que puede ser: A (adenina), C (citosina), G (guanina) o T (timina).

Oligonucleótido: pequeño fragmento de ADN de cadena simple compuesto por varias decenas de nucleótidos.

Par de bases: por extensión, se refiere a aquellos dos nucleótidos complementarios (A-T o C-G) que podrían considerarse como la unidad química del ADN de doble cadena.

PCR: técnica *in vitro* que permite la obtención de millones de copias de un fragmento de ADN específico a partir de una pequeña cantidad de ADN mediante una reacción enzimática cíclica.

Perfil genético: combinación de los genotipos obtenidos para múltiples loci.

Polimerasa de ADN: enzima capaz de sintetizar una cadena doble de ADN tomando como referencia la información presente en una cadena simple de ADN molde.

Polimorfismo: variación en el ADN entre individuos de una misma especie. Se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más de un 1% de la población. Existen dos tipos de polimorfismos: de longitud; los alelos de un locus se diferencian entre ellos por el número total de bases que lo componen: de secuencia, los alelos de un mismo locus se diferencian en la base (A, C, G o T) presente en una o más posiciones concretas.

Polimorfismo de un solo nucleótido: variación de una sola base en una posición concreta del ADN. En el ADN humano se han descrito más de 2 millones y se ha estimado que ocurren con una frecuencia aproximada de 1 SNP por cada 1 000 nucleótidos.

Renaturalización: proceso por el que las dos cadenas complementarias de una molécula de ADN desnaturalizada vuelven a asociarse al retirar su exposición al agente desnaturalizante.

RFLP («Restriction Fragment Length Polymorphism»): variaciones en la secuencia de un determinado locus que afectan al sitio donde una enzima de restricción corta un segmento de ADN y que, por tanto, determinan el tamaño de los fragmentos que resultan del corte.

Secuencia repetida en tándem: región de ADN repetitivo constituida por una secuencia determinada que se repite consecutivamente, una detrás de la otra, un número variable de veces. Atendiendo al tamaño de la unidad de repetición, estas secuencias se denominan: **satélite**; unidad de repetición de 1 000-10 000 nucleótidos; **minisatélite**: unidad de repetición de 7-100 nucleótidos; **microsatélite**; unidad de repetición de 2 a 6 nucleótidos.

Secuenciación: determinación del orden de bases en una molécula o fragmento de ADN.

SNP («*Single Nucleotide Polymorphism*»): *polimorfismo de un solo nucleótido.*

Sonda: fragmento de ADN de cadena simple marcado con un isótopo radiactivo o un agente quimioluminiscente, que se utiliza para detectar la presencia de secuencias de ADN complementarias. Puede ser:

Unilocus: reconoce una secuencia específica en un único locus y su hibridación tiene lugar en condiciones muy restrictivas.

Multilocus: reconoce secuencias presentes en diferentes locus y su hibridación tiene lugar en condiciones poco estrictas que requieren menor especificidad en la unión.

STR («*Short Tandem Repeats*»): *microsatélite.*

Termociclador: aparato en el que se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que permite un rápido y preciso calentamiento y enfriamiento de las muestras para que la PCR tenga lugar de forma óptima, así como una gran versatilidad en cuanto a su programación para ajustarse a cada aplicación concreta.

VNTR («*Variable Number of Tandem Repeats*»): *minisatélite.*

REFERENCIAS HISTORICAS

Breve cronología de algunas aportaciones científicas a la Biología Molecular e Ingeniería Genética a partir de 1866

- ❖ 1866 Gregorio Mendel describe los mecanismos de herencia de los caracteres (plasmados en sus famosas Leyes)
- ❖ 1900 Iros polimorfismos genéticos, grupos sanguíneos del sistema ABO, descubierto por Landsteiner.
- ❖ 1915 Pruebas de anticuerpos para grupos sanguíneos (ABO) introducidos y utilizados por Lattes.
- ❖ 1920 Leyes de Locard bajo el principio de “cada muestra tiene un linaje”.
- ❖ 1929 1920-1950, descubrimiento y uso de otros grupos sanguíneos y proteínas séricas (ej. sistema Rhesus, Lewis, Kell, haptoglobinas).
- ❖ 1952 Rosalind Franklin, descubre las formas A y B del ADN, demostró que las bases nitrogenadas estaban hacia adentro y dio los detalles más precisos acerca de las distancias moleculares en el ADN.
- ❖ 1953 Watson y Crick proponen la estructura de la doble hélice para el ADN.
- ❖ 1960 1960-1980. Huella genética, multilocus ADN desarrollado por Jeffreys, seguido por marcadores (SLP).
- ❖ 1984 Descubrimiento y uso de variantes electroforéticas de enzimas de los glóbulos rojos (Ej. fosfoglucomutasa, glioxidasa).
- ❖ 1986 Primeros usos de ADN en casos forenses (identificación del doble homicidio Pitchfork de Colin en Reino Unido).
- ❖ 1987 New York contra el juicio de Castro llevando un estricto control de calidad
- ❖ 1988 Primeros kits forenses comerciales de PCR, detectores de SNPs y polimorfismos de HLA-DQA1.
- ❖ 1991 Primeros usos de polimorfismos STRs.
- ❖ 1992 Primeros anuncios comerciales de STRs en el desarrollo de kits para casos forenses. 1er Y-STR analizado y utilizado en el caso de una violación en Alemania. 1er uso ante una corte de ADNmt en el caso de la violación de una niña en Reino Unido. Publicación del National Research Council reportan la tecnología de ADN en Ciencias Forenses

- ❖ 1993 1er caso de ADNmt en desastre de masas (Waco, Texas).
- ❖ 1995 Establecimiento del Banco de datos de ADN en Reino Unido (STR marcadores)
- ❖ 1996 Publicación del National Research Council reportando “la evaluación de la evidencia forense del ADN”
- ❖ 1997 El perfil del ADN de algunas células en huellas de objetos tocados.

(3,35,50)

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Estrada FCA. **Principales Métodos de Análisis de Semen en los Casos de Violaciones**. México: UNAM 2006.
- 2.- Rodríguez FC. **La creación de un banco genético para la identificación de cuerpos desconocidos que son enviados a la fosa común en el Distrito Federal**. México: UNAM 2007.
- 3.- Jobling M.A, and Gill P. **Encoded evidence: DNA in forensic analysis**. Nat. Rev. Genet. 2004 Vol. 5, No. 10: 739-51.
- 4.- Isenberg A.R.; **Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory Forensic Science communications**. 1999 USA July V I No. 2.
- 5.- **Schuller W, Fereday L, Scheithauer R**. Manual de Interpol sobre el intercambio y la utilización de datos relativos al ADN 1ª ed. Lyon, Junio 2001.
- 6.- Martínez CA, Mayor P. **El DNA mitocondrial humano y su expresión**. Mayo 2008 <http://www.lab314.com/jauja314.htm>
- 7.- Kobilinsky L, Levine L, Margolis H, Et al. **Inside Forensic Science Forensic DNA Analysis**. New York, USA: Chelsea House Plublishers. 2007
- 8.- Farreras C, Rozman C, **Medicina interna**. Vol. 2. 3ª ed. Ediciones Doyma . Bilbao 1996
- 9.- Martínez CJC. **El uso de ADN mitocondrial para descubrir las migraciones precolombinas al Caribe: Resultados para Puerto Rico y expectativas para la República Dominicana**. J. Of. Caribbean 2002
- 10.- Oliva VR, Ballestas MF, Oriola AJ. **Genética Medica**, 3ª ed. Díaz de Santos. Barcelona 2004.

- 11.- González AJF. **Análisis molecular de variación de polimorfismos STR autosómicos y de cromosoma “Y” en grupos étnicos de Ecuador con aplicación medico-forense.** Tesis Doctoral. España 2006
- 12.- Moreno GR, **Manual de introducción a la criminalística**, Ed. Porrúa, México 2006
- 13.- Lorente AM, Lorente AA, Villanueva CE. **La tecnología del ADN en Medicina Forense: Importancia del Indicio y del lugar de los hechos.** Cuad. De Med. For. No. 3. España 1996
- 14.- Paniagua GA, **Biología Celular**, 2ª ed. Mc.Graw Hill-Interamericana. España 2003
- 15.- García ME. **La utilización de la prueba de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) para la aplicación de la justicia en México** Universidad Internacional de América en Ciudad Victoria , México 2003
- 16.- Prieto SL. **Estudio de Polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados.** Tesis doctoral. Madrid 2002.
- 17.- Lewin, B. **Genes VII.** New York, N. Y. Oxford University Press. Inc. 2000
- 18.- Mas OJ. **Diagnóstico molecular en medicina.** México, El manual moderno, 2004.
- 19.- Crespillo M., Paredes M, Arimany J, Et. al. **Guerra Civil Española (1936-1939): identificación de restos humanos procedentes de fosas comunes en Cataluña mediante análisis de ADN Mitocondrial. A propósito de un caso.** Cuad. Med. Forense no. 38 Sevilla 2004
- 20.- Bandelt H, Maucalay V, Richards M. **Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens.** Springer. New York 2006
- 21.- Fernández DE. **Polimorfismos de ADN mitocondrial en poblaciones antiguas de la Cuenca Mediterránea.** Tesis Doctoral. Univ. De Barcelona.
- 22.- **Serie manuales y guías sobre desastre Manejo de cadáveres en situaciones de desastre.** Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. 2005.

- 23.- Sotelo LA, Eleta G, Gatti C. ADN y **Medicina Forense**. Cuadernos de Medicina Forense año 1, No. 1. Junio 2002;p 1-17
- 24.- Medina MIY. **Polimorfismo del ADN mitocondrial humano asociado a los virus del Papiloma Humano en cáncer de Cervix**. México: UNAM 2007.
- 25.- Thompson MW, Nussbaum RL, Mcinnes RR, Et al. **Genética en Medicina** , 5ª ed. Elsevier. España 2004.
- 26.- Chen J, Kobilinsky L, Wolosin D, Et. Al. **A Physical method for separating spermatozoa from epithelial cells in sexual assault evidence**. J. Forensic Sci. 1998; 43(1): 114-118
- 27.- **BIOMEDICA**: Revista de Instituto Nacional de Salud. Vol. 28 No. 3. Bogotá. Septiembre 2008: 358
- 28.- **INTERPOL**. Manual de Interpol sobre el Intercambio y la Utilización de datos Relativos al ADN. Organización Internacional de Policía Criminal Lyon Junio 2001
- 29.- Baker J, Allen G. **Biología e investigación científica**. Fondo Educativo Interamericano: México 1990
- 30.- Fernández RF. **Análisis de 15 loci tipo STR en la población de Paraguay para su uso en identificación forense**. España Universidad de Granada 2008.
- 31.- Díaz GJR. **Importancia de la Química Toxicología y Farmacología en el campo Forense**. México: UNAM 2006.
- 32.- Strachan, T. **The human genome**. BIOS Scientific Publishers. USA 1992
- 33.- Costa J. **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología**. Hospital Clinic. 2004 Barcelona España. 88-93.
- 34.- **Penacino, G. A. 2006** Actualización en estudio de paternidad por Análisis de ADN. www.adn.ac/ **Tesis**
- 35.- Zúñiga RR. **Utilidad y Avances en pruebas de Paternidad con aplicaciones en Criminalística**. México UNAM 2006

- 36.- Carracedo A. **Forensic DNA Typing Protocols. Methods in molecular Biology** V.2 Human Press. New Jersey 2005
- 37.- Butler JM. **Forensic DNA typing: Biology, Technology, and Genetics of. STR Markers.** Elsevier. San Diego USA 2005
- 38.- Bienvenue JM, Duncalf N, Marchiarullo D. **Microchip-Based Cell Lysis and ADN Extraction from Sperm Cells for Application to forensic Analysis.** J. Forensic Sci. March 2006, Vol.51 No. 2: 266-73
- 39.- FBI Laboratory: **DNA Analysis Unit II Mitochondrial DNA Analysis Protocol.** New York. Abril 2002.
- 40.- Lorente AJ, Lorente AM. **ADN y la investigación en la investigación criminal y en la paternidad biológica.** Colmares, México 1995.
- 41.- Alonso AA. **Conceptos básicos de ADN forense. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.** Servicio de Biología. Madrid 2004
- 42.- **Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM),** Forensic Science Communications April 2003 . Volume 5 Number 2
- 43.- González AF, Sánchez D. **El nuevo Código de la Niñez y la Adolescencia y la prueba material del ADN (Ácido Desoxirribonucleico): Programa nuestros niños.** Ecuador 2004.
- 44.- Morales CAI, Morera B, Jiménez G. **La implementación forense de la tecnología del ADN en Costa Rica: Un análisis retrospectivo.** Rev. biol. trop. Sep. 2004. Vol. 52, No. 3: 695-712
- 45.- Rodríguez CJV. **Introducción a la Antropología Forense: Análisis e identificación de restos óseos humanos.** Consultado Junio 2008. <http://www.scribd.com/doc/8535069/criminologia-introduccion-a-La-Antropo...>

- 46.- Hunter P. **All the evidence: The combination of molecular biology, zoology and botany in forensic science comes as a great help to crime investigators.** EMBO reports, Vol. 7, No. 4: 352-54
- 47.- García VF, Domínguez M. **Las hélices paralelas, una visión crítica de la era genómica y postgenómica.** Universidad del Valle 2003
- 48- Alex MG, Ph D. **Filtration Based DNA Preparation for Sexual Assault Cases.** J. Forensic Sci. September 2003, Vol. 48, No. 5: 1-4
- 49.- Applied Biosystems Universidad de HID/**Tendencias futuras en tecnologías de ADN Forense en Albany,** New York; Mayo de 2006.
- 50.- Solari AJ. **Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina.** 3^a ed. Panamericana: México; 2004.