



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

AVANCES DE LA GENÉTICA FORENSE

VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

SONIA DÍAZ MÉNDEZ



MÉXICO, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ

VOCAL: Profesor: MARIA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS

SECRETARIO: Profesor: RAUL LUGO VILLEGAS

1er. SUPLENTE: Profesor: MARIA EUGENIA IVETTE GOMEZ SANCHEZ

2° SUPLENTE: Profesor: JORGE RAFAEL MARTÍNEZ PENICHE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

AUDITORIO DE LA FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

RAUL LUGO VILLEGAS

SUSTENTANTE:

SONIA DÍAZ MENDEZ

DEDICATORIA

Agradezco en primera instancia a **DIOS** por darme la fortaleza y oportunidad de finalizar con éxito, a pesar de los tropiezos que se me han presentado en el camino.

A mis Padres:

Sus aspiraciones han tomado forma y se han convertido en realidad, hoy recogen el primer fruto de una labor que se ha venido cultivando poco a poco a lo largo de nuestras vidas, en el fondo de sus corazones hay satisfacción y en el mío agradecimiento. Por el apoyo, cariño, comprensión y amor que me han brindado hasta ahora, ¡Los quiero!

A mis abuelitos:

Porque han sido una parte muy importante en mi desarrollo personal, dándome cariño, comprensión y apoyo y aunque mi abuelito no esté físicamente con nosotros, se que donde quiera que este, estará orgulloso de mi. ¡Te quiero abuelito!

A mis Hermanas:

Por apoyarme cuando me sentía rendida y me motivaban para seguir adelante.

A la Universidad:

Por facilitarme sus instalaciones durante la estancia que estuve en ella, así como a los profesores que me transmitieron su experiencia.

A mi Jurado:

Por el tiempo que me han brindado, para que este proceso se me hiciera lo menos tedioso posible.

¡Muchas Gracias a todos!

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I. OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
CAPÍTULO II INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO III. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA MOLÉCULA DE ADN	12
CAPÍTULO IV. EL ADN COMO MATERIAL GENÉTICO Y HEREDITARIO	15
CAPÍTULO V. ESTRUCTURA DEL GENOMA HUMANO	17
CAPÍTULO VI. AVANCES DE LA GENÉTICA FORENSE	18
CAPÍTULO VII. CONCEPTO DE MUESTRAS DUBITADAS E INDUBITADAS	23
CAPÍTULO VIII. PRUEBAS PRELIMINARES DE MUESTRA GENÉTICO-BIOLÓGICAS	25
CAPÍTULO IX. IDENTIFICACIÓN DE INDICIOS	27
CAPÍTULO X. TIPOS DE INDICIOS	29
a) Muestras de sangre	29
b) Muestras de semen	33
c) Muestras de saliva	37
d) Muestras de células de descamación	39
e) Muestras de pelo	41
f) Muestras de tejido	43
g) Uñas	45
h) Restos óseos	46
i) Dientes	48
A. INDICIOS MENOS FRECUENTES	50
a) Restos de orina	50
b) Heces	50

CAPÍTULO XI. PROBLEMÁTICA DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	51
CAPÍTULO XII. MARCADORES GENÉTICOS DE INTERÉS FORENSE	54
A. TIPOS DE POLIMORFISMOS	54
B. ELECCIÓN DE POLIMORFISMOS A ESTUDIAR	55
a) ADN mitocondrial	55
b) ADN nuclear (genómico)	56
c) Cromosoma Y	57
c.1. Casos de paternidad	57
c.2. Casos de mezclas	57
c.3. Como herramienta de “screening”	58
C. ANÁLISIS DE ADN MINISATÉLITES MEDIANTE SONDAS	59
a) Sondas multilocus	59
b) Sondas de locus único (SLPs Single Locus Probes)	59
D. ANÁLISIS DE VNTRs (Número Variable de Repeticiones en Tandem) MEDIANTE EL ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)	60
E. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE ADN MEDIANTE PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	61
a) Otras aplicaciones forenses de la PCR	61
F. STRs AUTOSÓMICOS DE USO GENERALIZADO EN GENÉTICA FORENSE	62
G. OTROS MARCADORES DE ADN CON INTERÉS FORENSE	64
1. Un marcador de sexo: Amelogenina	64
2. STRs del cromosoma Y	64
3. ADN mitocondrial	65
4. Polimorfismos de un solo nucleótido	67

CAPÍTULO XIII. HUELLA GENÉTICA (FINGERPRINTER)	68
CAPÍTULO XIV. ESTUDIOS REALIZADOS EN GENÉTICA FORENSE	69
a) Estudios de filiación	69
b) Estudios de identificación de restos cadavéricos	69
c) Identificación de indicios biológicos de interés criminal	69
d) Identificación de especie	70
e) Estudios complementarios en casos de muerte por sumersión o asfixia	70
CAPÍTULO XV. METODOLOGÍAS REALIZADAS A LAS MUESTRAS DE INTERÉS FORENSE	71
A. EXTRACCIÓN DE ADN	71
A.1. Métodos de extracción	71
B. PURIFICACIÓN DE ADN	74
C. CUANTIFICACIÓN DE ADN	75
C.1 Fluorometría	76
C.2 Espectrofotometría	76
C.3 Minigel de agarosa	77
D. AMPLIFICACIÓN DE ADN	79
a) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	79
b) Riesgos y limitaciones de la PCR	85
E. DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO O TIPAJE	87
CAPÍTULO XVI. SISTEMAS DE DETECCIÓN DE ADN	88
a) Principios básicos de electroforesis	88
b) Secuenciación	88
CAPÍTULO XVII. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	92

CAPÍTULO XVIII. BASES DE DATOS	94
CAPÍTULO XIX. DISCUSIÓN	97
CAPÍTULO XX. CONCLUSIÓN	98
CAPÍTULO XXI BIBLIOGRAFÍA	99
CAPÍTULO XXII. GLOSARIO	102

I. OBJETIVO GENERAL

Dar a conocer las actualizaciones generales respectivas de las técnicas correspondientes a la Genética Forense, ya que actualmente este rubro es de suma importancia para obtener información de las muestras que se obtienen de la escena del crimen, así como del posible sospechoso, para realizar una comparación de ambos perfiles genéticos, convirtiéndose estas en una evidencia, que nos permitirá concluir con una probabilidad de que ambos perfiles pueden corresponder.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Llevar a cabo una breve introducción de los indicios que pueden ser encontrados en el lugar de los hechos; así como su ubicación, muestreo, pruebas presuntivas y confirmativas.
2. Revisar las respectivas técnicas analíticas empleadas en la Genética Forense y su fundamento, para colaborar de manera eficiente con los órganos de justicia a dar una posible solución del hecho perseguido.
3. Dar a conocer que en estos casos en los que se persigue un delito, principalmente una violación; se realizan comparaciones de las muestras corridas en gel mediante mediciones de las distancias recorridas, extrapolarlo dichos datos en la curva estándar de fragmentos con pares de bases conocidas.
4. Tener en mente que si se cuenta con algún patrón, se puede establecer una comparación de este mismo con una o más muestras, demostrando si este coincide o no con la muestra, si coincide se identifica como "ADN de una escena del crimen".

II. INTRODUCCIÓN

La primera aplicación de la tecnología del ADN en la resolución de un caso judicial data de 1985, cuando las autoridades británicas exigieron una prueba biológica de filiación en un asunto de inmigración. La prueba fue reclamada para autorizar la entrada en el país de un joven perteneciente a una familia de Ghana residente en Londres, ante la sospecha de falsificación del pasaporte a la vuelta de un viaje desde su país de origen.

Este tipo de análisis no era ninguna novedad si se tiene en cuenta que la identificación de individuos se ha llevado a cabo desde principios del siglo XX mediante el estudio de caracteres hereditarios como son los grupos sanguíneos asociados a los glóbulos rojos (antígenos eritrocitarios: ABO, Rh, y otros) y, posteriormente, a través del análisis de proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y antígenos leucocitarios como el sistema HLA (Human Leukocyte Antigen) Antígenos Leucocitarios Humanos, que son antígenos formados por moléculas que se encuentran en la superficie de casi todas las células de los tejidos de un individuo, y también los glóbulos blancos (leucocitos) de la sangre.

HLA es el nombre que recibe el mayor complejo de histocompatibilidad en humanos. Siendo un conjunto de genes implicados en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario.

Con la gama de ensayos disponibles a principios de los años 80, la investigación biológica de la paternidad era posible con suficientes garantías.

Sin embargo, con los resultados obtenidos en el caso del joven de Ghana, cuyo padre no estaba disponible, se pudo deducir que pertenecía al entorno familiar de su supuesta madre, pero no se podía resolver si era su hijo biológico o su sobrino. El Ministerio de Interior británico solicitó la colaboración de Alec Jeffreys, profesor de Genética de la Universidad de Leicester, que acababa de publicar la posibilidad de aplicar el análisis de determinadas regiones repetitivas y polimórficas del ADN a cuestiones de identificación humana, incluidos los estudios de filiación. Mediante el análisis de la huella genética del joven y de su presunta madre y tres hermanos pudo confirmarse la maternidad.

Un año más tarde, esta tecnología se aplicó por primera vez a un caso criminal abierto en el Reino Unido por violación y asesinato de dos jóvenes en 1983 y 1986 en el condado de Leicester y en el que la «prueba del ADN» no sólo contribuyó a la identificación del culpable sino también a demostrar que la confesión del hombre inicialmente detenido y acusado de los crímenes era falsa.

Desde entonces hasta hoy en día, la tecnología del ADN ha experimentado un espectacular avance del que se ha visto beneficiada enormemente la Genética Forense, entre muchas otras disciplinas. Actualmente la «prueba del ADN» constituye una práctica de enorme trascendencia en muchos casos judiciales lo cual ha supuesto en los últimos años un incremento considerable en la intervención de este tipo de pericias en los tribunales de justicia.

El avance tecnológico del ADN ha resultado en un incremento en la habilidad para desarrollar pruebas de identificación humana. La identificación individual es deseable en un sin número de situaciones incluyendo la determinación de la perpetración de un crimen violento, tal como un asesinato o una violación, resolución de paternidad e identificación de restos de personas extraviadas, así como en los casos de desastres masivos.

El descubrimiento de las regiones hipervariables de ADN por Jeffreys y colaboradores (1985) y la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han supuesto una de las mayores innovaciones en las Ciencias Forenses, principalmente en la Genética Forense.

Para que un marcador analizable por PCR pueda ser considerado de utilidad en Genética Forense debe ser un polimórfico y poseer un alto grado de heterocigosidad genética. Antes de ser aceptado como integrante de la rutina forense es indispensable disponer de datos fiables acerca de la distribución de sus frecuencias alélicas en la población general, además de cumplir una serie de requisitos y pasar sucesivos controles para su validación como tal.

Los polimorfismos del cromosoma Y son indudablemente de un gran interés forense y permiten asignar datos sobre problemas de identificación o casos de paternidad de difícil solución como polimorfismos de ADN de cromosomas autosómicos, pero sobre todo, permiten el análisis de vestigios de interés criminal, particularmente restos de espermatozoides mezclados con células femeninas en el que la extracción diferencial no tiene éxito.

Actualmente las pruebas genéticas realizadas sobre restos biológicos es una actividad rutinaria en el entorno forense. El análisis de muestras involucradas en ciertos delitos puede ayudar a esclarecer cómo ocurrieron los hechos o quienes intervinieron en los mismos. Asimismo, la aplicación de técnicas moleculares en la identificación de cadáveres ha permitido resolver aquellos casos que no podían solventarse mediante técnicas clásicas de identificación (huella dactilar, ficha dental, etc).

Este tipo de pruebas se caracterizan por su objetividad, ya que se basan en fundamentos científicos plenamente demostrados y validados. Los resultados que se obtienen en el análisis de evidencias en un laboratorio por tanto, han de coincidir plenamente con los obtenidos en otros diferentes, si todos son científicamente rigurosos y cumplen con las condiciones de calidad. En este sentido es de gran importancia asegurarse de que las pruebas sean realizadas en un laboratorio acreditado.

III. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA MOLÉCULA DE ADN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la molécula portadora de la información genética, la cual se encuentra en el núcleo de cada una de las células que componen el cuerpo humano (excepto en los glóbulos rojos que carecen de núcleo, por ser células muy especializadas). Es heredada de ambos progenitores y es única para cada individuo, con excepción de los gemelos idénticos. Cada molécula de ADN consiste en una hélice formada por una doble cadena en la que los eslabones son unidades químicas denominadas *nucleótidos*. Los nucleótidos están constituidos por tres componentes:

- ☞ Un azúcar
- ☞ Un fosfato
- ☞ Una base nitrogenada

Existen cuatro nucleótidos distintos que se diferencian en la base que portan:

- ☞ A (adenina)
- ☞ C (citosina)
- ☞ G (guanina)
- ☞ T (timina)

Por tanto, puede decirse que el alfabeto del ADN está compuesto por cuatro letras cuya combinación a lo largo de la molécula puede dar lugar a infinidad de secuencias distintas. El orden o secuencia en que se disponen los diferentes nucleótidos a lo largo de la cadena determina la información genética.



Figura 1: Molécula de ADN.

En la estructura de doble hélice del ADN (descrita por primera vez por Watson y Crick en 1953), las dos cadenas permanecen unidas mediante un proceso conocido como *hibridación*. En esa doble cadena hay unas reglas fijas de complementariedad. 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). Esto permite que conociendo la secuencia de una de las cadenas pueda deducirse la de la cadena complementaria.

La hibridación es una propiedad fundamental del ADN en su estado natural en la célula, sin embargo, los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas pueden romperse mediante elevación de la temperatura o tratamiento químico, proceso denominado desnaturalización. Un procedimiento común para desnaturalizar la doble cadena de ADN es calentarlo a temperaturas cercanas al punto de ebullición o bien exponerlo a agentes químicos desnaturalizantes, como la urea o la formamida.

La desnaturalización es un proceso reversible: si un fragmento de ADN se calienta se separarán sus dos cadenas, pero si se disminuye la temperatura, las cadenas de ADN encontrarán a su complementaria y se unirán mediante un proceso llamado *renaturalización*.

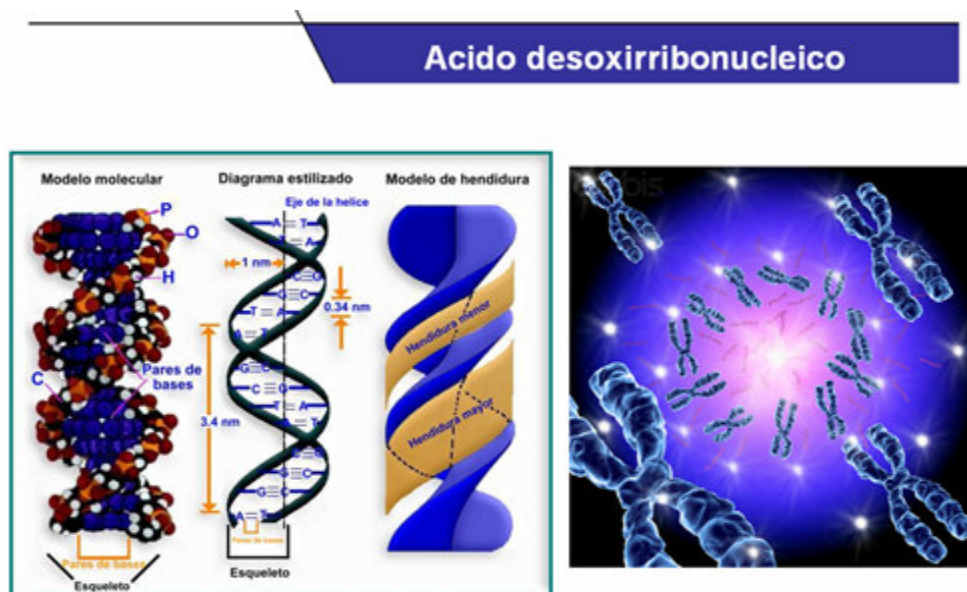


Figura 2: Estructura de la doble cadena del ADN. A) Apareamiento de bases nitrogenadas complementarias y B) Estructura tridimensional del apareamiento de las bases.

Las regiones de la molécula del ADN que contienen genes, son conocidas como “regiones codificantes” y se dice que son esenciales, porque son las que nos hacen humanos. Sin embargo, los genes comprenden solo el 2% del genoma humano, el resto está constituido por “regiones no codificantes”, las cuales no tienen una función biológica y consecuentemente, se describen con frecuencia como ADN no esencial.

IV. EL ADN COMO MATERIAL GENÉTICO Y HEREDITARIO

La unidad vital básica es la célula, que funciona como una fábrica en miniatura produciendo los materiales y la energía necesarios para mantener la vida. Un ser humano está compuesto por un promedio de aproximadamente 100 billones de células, las cuales se originaron a partir de una única célula: el cigoto, originado por la fertilización de un óvulo por un espermatozoide.

En una célula humana, el ADN se localiza principalmente en el núcleo, aunque también existe una pequeña cantidad de ADN en las mitocondrias, que son los orgánulos celulares encargados de la producción de energía.

El *ADN nuclear* mide aproximadamente dos metros de longitud en su totalidad, pero se encuentra dividido y muy compactado en los *chromosomas*, 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.

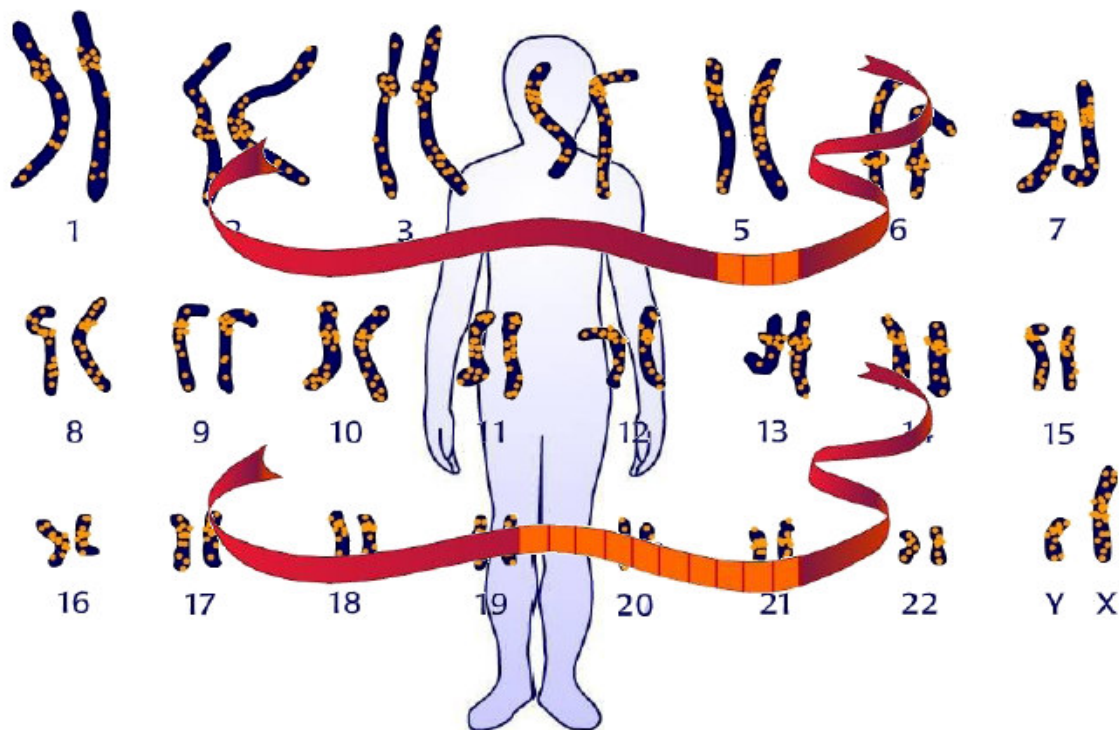


Figura 3: Cromosomas Humanos.

La mayor parte de los análisis de identificación genética humana se centran en marcadores polimórficos localizados en los cromosomas autosómicos, y la determinación del sexo se lleva a cabo con algunos marcadores localizados en los cromosomas sexuales. No obstante, el análisis del *ADN mitocondrial* y de otros marcadores polimórficos presentes en los cromosomas sexuales (principalmente en el cromosoma Y) está ganando un creciente interés debido a sus especiales particularidades que abordaremos más adelante.

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.

V. ESTRUCTURA DEL GENOMA HUMANO

El genoma humano está constituido por unos 3,000 millones de *pares de bases*. Sólo el 2% del ADN humano es codificante, o sea, forma parte de los genes. El 98% restante constituye el ADN no codificante al que se le atribuye, entre otras desconocidas, una función estructural y reguladora. Es en este ADN donde se concentra la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos, ya que sus *mutaciones* no están sometidas a una selección tan fuerte como las que ocurren en el ADN codificante, que pueden tener importantes consecuencias fenotípicas. Casi la mitad del ADN no codificante está constituido por ADN repetitivo, entre el que cabe destacar las *secuencias repetidas en tándem* (STRs), constituidas 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:

- ∞ *satélites* (unidad de repetición: 1.000-10.000 nucleótidos)
- ∞ *minisatélites* (unidad de repetición: 7-100 nucleótidos)
- ∞ *microsatélites* (cuya unidad de repetición contiene de 2 a 6 nucleótidos).

La posición que ocupa una determinada secuencia de ADN en el cromosoma se denomina *locus*. En una célula humana cada locus se encuentra por duplicado, uno en el cromosoma de origen paterno y el otro en el cromosoma de origen materno. A cada una de las distintas formas alternativas que ocupan un locus (que aunque muy similares entre ellas presentan alguna diferencia) se le denomina *alelo*. Cuando un individuo presenta en el locus paterno un alelo distinto al presente en el locus materno, se dice que es *heterocigoto* para ese *locus*, mientras que si ha heredado de ambos progenitores el mismo alelo, será *homocigoto*. A la caracterización de los alelos presentes en un determinado locus se le denomina *genotipo*.

Un *perfil genético* es la combinación de los genotipos obtenidos para múltiples loci. En el caso del ADN que sólo está presente en estado haploide y que, por tanto, todos sus loci se heredan siempre de forma conjunta (p. ej. el cromosoma Y –de herencia paterno el ADN mitocondrial –de herencia materna-) a esta combinación de genotipos se le denomina *haplotipo*.

VI. AVANCES DE LA GENÉTICA FORENSE

La **Genética forense** consiste en el análisis del polimorfismo responsable de la variabilidad genética en la población humana aplicada a los problemas judiciales. Estos pueden ser:

- **Investigación de la paternidad:** Impugnación por parte del supuesto padre o reclamación por parte de la madre y/o del hijo.
- **Criminalística:** Asesinato y delitos sexuales (violación). Se analizan restos orgánicos humanos (sangre, pelo, saliva, esperma, piel).
- **Identificación:** Restos cadavéricos (por ejemplo, los restos del zar Nicolás II de Rusia y su familia) o personas desaparecidas (como sucedió en Argentina con los niños desaparecidos durante la dictadura militar).

La tecnología fundamental de la perfilación del ADN fue desarrollada como resultado de un descubrimiento inesperado por el profesor Sir. Alec Jeffreys y colegas en los 80's, la perfilación del ADN se refiere a la identificación de partes específicas (regiones no codificantes) de la molécula de ADN de una persona. Es una técnica, que posibilita a los especialistas en ADN comparar dos muestras biológicas y determinar la concordancia de que estas muestras provengan de un mismo individuo.

El uso de la perfilación del ADN como una herramienta en las investigaciones criminales o en el ámbito de lo familiar está bien establecido. Los avances de la técnica a través de la automatización y computarización, y las mejoras en la sensibilidad y aplicación del método permiten la investigación y examen de los escenarios de diversos delitos con la perfilación de diversas muestras biológicas humanas (sangre, semen, saliva, piel, cabello con bulbo y otros tejidos) encontradas en éstos.

La perfilación del ADN puede ahora ser usada para establecer la paternidad inequívoca o la identidad verdadera de un individuo, vinculando a un sospechoso en la escena de un crimen o de una víctima relacionando delitos perpetrados por el mismo delincuente en la escena del crimen o de una o varias víctimas y excluir o exonerar a individuos inocentes de sospecha.

Actualmente la aplicación de la prueba de ADN ha revolucionado dentro de la investigación criminal, se ha convertido en una poderosa herramienta para la identificación de personas, en casos criminales para establecer la relación de un sospechoso con la evidencia dejada en la escena de un crimen (p. ej. mancha de sangre); como violación o asesinato y en pruebas de paternidad.

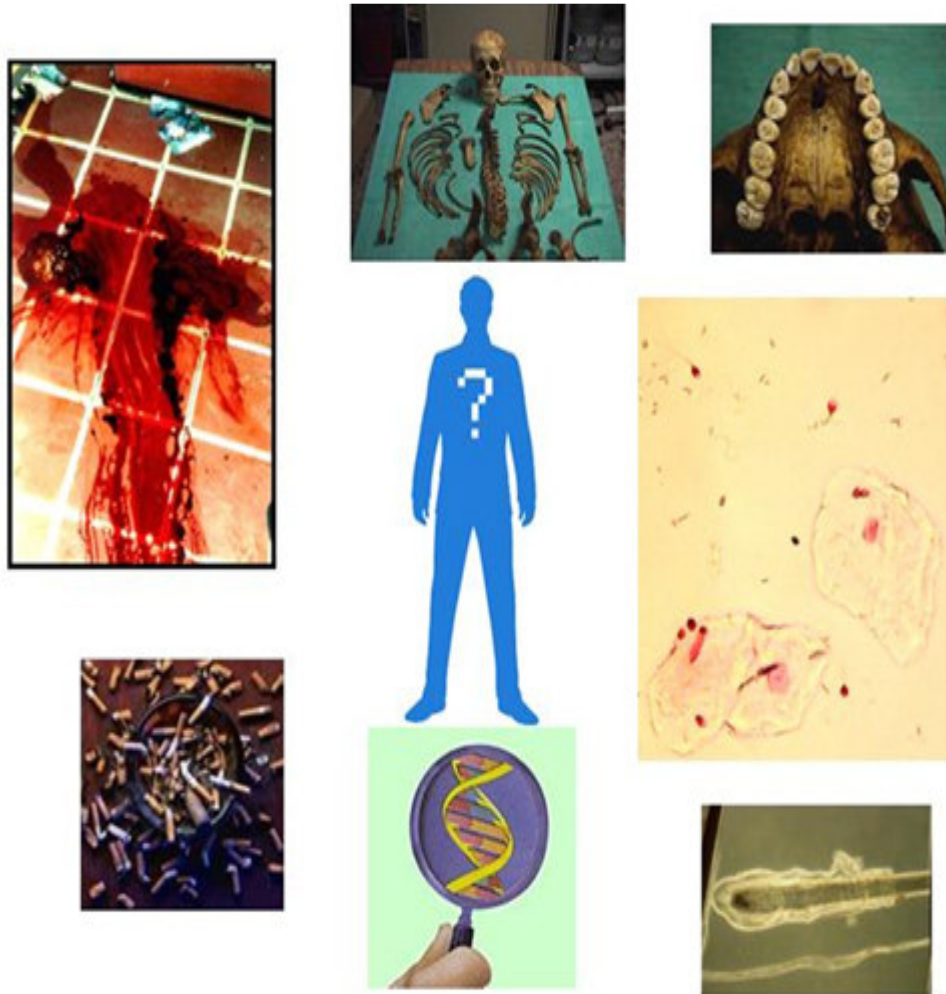


Figura 4: Muestras biológicas humanas.

Otras aplicaciones menos comunes son para establecer relaciones familiares de restos cadavéricos en casos de desastres o personas desaparecidas, en investigaciones históricas, o antropológicas al analizar poblaciones humanas para estudiar su origen y evolución.

En genética forense se estudian fragmentos de ADN que están situados tanto en los autosomas como en los cromosomas sexuales (XY). Dado que el cromosoma Y sólo existe en varones, es importante conocer cómo se hereda; todos los individuos varones emparentados por línea paterna comparten el cromosoma Y (casi en su totalidad) pues se hereda directamente de padres a hijos sin mezclarse con ningún material procedente de la madre (Figura 5A). Por tanto, no es posible identificar individuos mediante el estudio de su cromosoma Y, sólo es posible identificar linajes paternos.

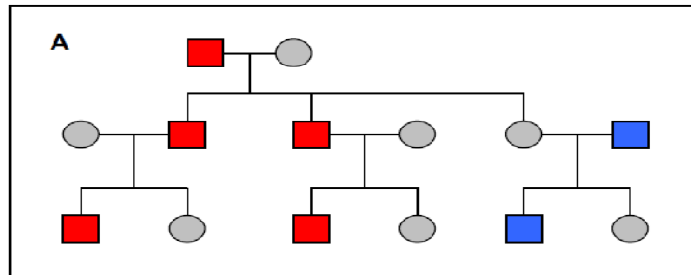


Figura 5: Herencia (A): Cromosoma Y: en rojo los individuos que comparten este cromosoma (ausente en las mujeres).

Además del ADN nuclear existe otro tipo de ADN denominado ADN mitocondrial (ADNmt) mucho más corto (unos 16500 eslabones) localizado dentro de unos orgánulos celulares llamados mitocondrias presentes en el citoplasma. Existen numerosas mitocondrias en cada célula y varias copias de ADNmt en cada mitocondria, es decir, existe mayor cantidad de copias de ADNmt que de ADNn por célula. Este hecho hace que en muestras forenses muy críticas (con escasa cantidad de ADN o con ADN en mal estado) tenga más éxito el análisis de ADNmt que el estudio de ADNn.

Sin embargo, el ADNmt presenta una peculiaridad, se hereda única e íntegramente de la madre, es decir, todos los individuos relacionados familiarmente por vía materna presentan idéntico ADNmt. Por tanto no permite la identificación de individuos, sino de líneas familiares maternas.

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. 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 (Tabla 1).

MARCADOR	ALELOS DETECTADOS EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA
HUMTH01	5, 6, 7, 8, 9, 9.3,10 y 10
CSF1PO	7, 8, 9,10, 11, 12,13, 14 y 15
D8S1179	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18

Tabla 1. Ejemplos de marcadores utilizados en genética forense y sus alelos en población española.

Cada individuo hereda un alelo de su madre y otro de su padre. Si los alelos heredados en un marcador concreto coinciden diremos que el individuo es homocigoto y si difieren se tratará de un heterocigoto (Figura 6). Así, un individuo que herede de ambos progenitores el alelo 7 en el marcador TH01 será homocigoto 7-7 y otro que herede el alelo 7 de su padre y el 8 de su madre, será heterocigoto 7-8.

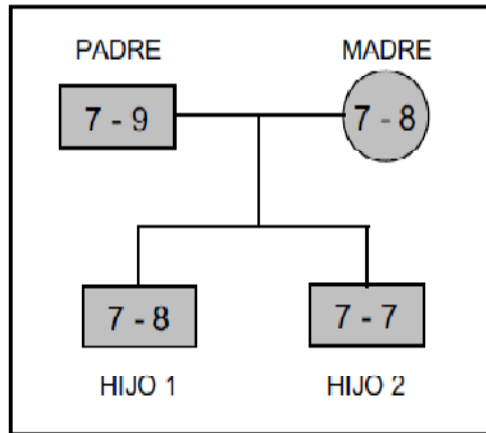


Figura 6: Homocigotos y heterocigotos. Para cierto marcador de ADN nuclear autosómico, el hijo 1 (heterocigoto) heredó el alelo 7 de su padre y el 8 de su madre. El hijo 2 (homocigoto) heredó el alelo 7 tanto de su padre como de su madre.

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 2).

MUESTRA	TH01	TPOX	CSF1PO	D3S1358	VWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820	SEXO
1	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 2: Perfil genético de una muestra biológica.

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.

VII. CONCEPTO DE MUESTRAS DUBITADAS E INDUBITADAS

Para que una pericia genético biológica sea concluyente es imprescindible desarrollar el análisis en dos tipos de muestras:

a) Muestras dubitadas o evidencias: son restos biológicos de procedencia desconocida, es decir, no sabemos a quién pertenecen (por ejemplo las muestras recogidas en la escena del delito o de un cadáver sin identificar).

b) Muestras indubitadas o de referencia: son restos biológicos de procedencia conocida, es decir, sabemos a quién pertenecen (por ejemplo la sangre tomada de un cadáver identificado, o las muestras tomadas a familiares de un desaparecido).

La analítica del ADN se ha denominado en múltiples ocasiones «huella genética»; este término no debe llevarnos a confusión pues, si bien es verdad que cada individuo presenta un ADN diferente (como en el caso de las huellas dactilares), no existe una base de datos formada por las características genéticas de cada individuo que vive en cierto país (a diferencia de la huella dactilar, de la cual existe un registro del dedo índice derecho de todas las personas). Por este motivo, sólo podremos identificar las evidencias biológicas si disponemos de muestras de referencia para su comparación.

Los tipos de muestras dubitadas (Figura 7) más frecuentemente analizadas por técnicas genético molecular son:

- ☞ sangre (habitualmente en forma de mancha)
- ☞ semen (lavados vaginales o manchas sobre prendas de la víctima)
- ☞ saliva (colillas de cigarrillo, chicles, sobres y sellos)
- ☞ pelos
- ☞ uñas
- ☞ tejidos blandos
- ☞ restos óseos
- ☞ dentarios (estos últimos relacionados fundamentalmente con la identificación de cadáveres)



Figura 7: Algunos tipos de muestras dubitadas. De izquierda a derecha, arriba: manchas de sangre, manchas de semen, manchas de saliva y pelo; abajo: tejido muscular, uñas, restos óseos y restos dentarios.

El tipo de muestras indubitadas más habituales son sangre y saliva (frotis bucal). No es necesario que las muestras de referencia sean del mismo tipo que las evidencias, es decir, podremos comparar distintos tipos de restos biológicos entre sí ya que el ADN es igual en todos los tejidos de un mismo individuo. Podemos diferenciar tres etapas principales en el análisis de una muestra forense (Figura 8):

- (i) pruebas preliminares para determinar la naturaleza y el organismo de procedencia de la muestra.
- (ii) análisis del ADN presente en la muestra con fines identificadores.
- (iii) análisis e interpretación de los resultados obtenidos.



Figura 8: Etapas en el análisis de una muestra forense.

VIII. PRUEBAS PRELIMINARES EN MUESTRAS GENÉTICO BIOLÓGICAS

Antes de realizar un estudio de ADN con el fin de individualizar las evidencias existen pasos previos en los procedimientos analíticos que nos permiten discriminar el tipo de resto biológico ante el que nos encontramos. Ello se logra a través de las pruebas preliminares, que si bien son más sencillas que el propio análisis del ADN presente en una muestra, no por ello son menos importantes. El peso de la evidencia varía según se trate de un tipo de resto biológico u otro, es decir, no es lo mismo hallar una mancha de sangre (que puede implicar lucha) que un filtro de cigarrillo (que simplemente puede indicar la presencia de un individuo en la escena del delito, pero no necesariamente su participación activa en él). Sin embargo, en cada caso las circunstancias son diferentes y muestras biológicas que quizá no tengan relevancia en un hecho delictivo la pueden tener en otro distinto.

Existen fundamentalmente *tres tipos de pruebas preliminares*:

- a) Orientativas
- b) De certeza
- c) Especifica

a) *Orientativas*: se trata de técnicas que nos revelan la posible naturaleza de la mancha pero no nos la aseguran, es decir, sirven sólo para descartar, pero no para concluir. Por ejemplo, la llamada reacción de Adler que es una prueba colorimétrica que si resulta positiva nos orienta a pensar que estamos ante una mancha de sangre, pero sin poder asegurarlo pues existen otras sustancias (jugos vegetales, óxido, lejía) que también dan positiva esta reacción. Si la prueba resulta negativa podremos asegurar que el resto que estamos analizando no es sangre. Estas pruebas son sencillas de realizar, son de bajo coste, muy rápidas, y nos ayudan a seleccionar las manchas a analizar.

b) *De certeza*: permiten determinar el tipo de resto biológico analizado con seguridad. La detección de hemoglobina en la muestra para determinación de sangre o la visualización al microscopio de espermatozoides para la determinación de semen son algunos ejemplos (Figura 9).

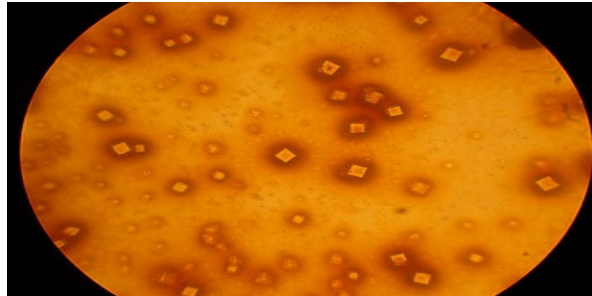


Figura 9: Pruebas de certeza: Sangre, las pequeñas estructuras que rodean a la fibra son cristales de Teichman formados a partir de la hemoglobina.

c) Específicas: permiten determinar el tipo de organismo al que pertenece el resto biológico. Una vez determinado el tipo de muestra que se debe de analizar, interesa saber si se trata de una muestra humana o no. Existen principalmente dos tipos de pruebas específicas:

- i. basadas reacciones antígeno-anticuerpo
- ii. estudio de ciertas regiones del ADN

Si bien, en cierto tipo de muestras (pelos, restos óseos) puede realizarse un estudio de las características morfológicas para determinar el tipo de organismo. En el caso de que nos encontremos ante una muestra de origen animal, normalmente los análisis terminarán en este punto a no ser que el objetivo sea precisamente determinar la especie (por ejemplo, en caso de delitos ecológicos y de caza furtiva). En caso de muestras de origen humano se procederá a realizar la segunda etapa del estudio destinada a individualizar la muestra mediante técnicas de ADN.

Conviene señalar que en determinadas ocasiones no es posible determinar el tipo de resto biológico hallado por la escasa cantidad de muestra disponible. En estos casos se suele proceder directamente a realizar los estudios de ADN para intentar individualizar la muestra.

IX. IDENTIFICACIÓN DE INDICIOS

Existen pocas células suficientes para obtener ADN útil por lo tanto se debe ser muy cuidadoso en su recolección. Es importante recordar que el hecho de no poder ver las manchas no significa que no sean suficientes para un análisis. Dichas muestras pueden colocar a un individuo en la escena del crimen, en una casa, o en un cuarto en el que el sospechoso declaró no haber estado; puede refutar una declaración de auto-defensa y poner un arma en la mano del sospechoso; puede dar infinidad de pistas clave para la resolución de un caso.



Figura 10: Tipos de indicios donde podemos encontrar ADN.

La siguiente es una tabla de identificación de ítems donde se encuentra evidencia comúnmente, su posible ubicación y la fuente biológica conteniendo las células.

Evidencia	Posible Ubicación de la Evidencia	Fuente de ADN
Bate de baseball o arma similar	En el extremo del mango	Transpiración, piel, sangre, tejido.
Sombrero, máscara	En el interior	Transpiración, pelo, caspa.
Anteojos	Partes de nariz u orejas, lente	Transpiración, piel
Tejido facial, algodón	Superficie	Mucosidad, sangre, transpiración, semen, cera del oído.
Ropa sucia	Superficie	Sangre, transpiración, semen
Cigarrillo fumado	Colilla del cigarrillo	Saliva
Estampilla o sobre	Área lamida	Saliva
Cinta, ligadura	Por dentro/fuera	Piel, transpiración
Botella, lata o vidrio	Lados, boca	Saliva, transpiración
Preservativo usado	Superficie interna y externa	Semen, células vaginales o rectales
Sábana, frazada o cubre almohada	Superficie	Transpiración, pelo, semen, orina, saliva
Balas	Superficie	Sangre, tejido
Marca de mordedura	Piel de una persona o ropa	Saliva
Uñas, o fragmentos de uñas	Raspaduras	Sangre, transpiración, tejido

Tabla 3: Posible identificación de muestras biológicas

X. TIPO DE INDICIOS

Los tipos de indicios más comúnmente estudiados en el laboratorio de biología genética son:

- a) Muestras de sangre
- b) Muestras de semen
- c) Muestras de saliva
- d) Muestras de células de descamación
- e) Muestras de pelos
- f) Muestras de tejidos
- g) Uñas
- h) Restos óseos
- i) Dientes

Se presentan sobre una amplia variedad de soportes. Casi todos tienen en común que son escasos, están degradados o contaminados y son únicos e irrepetibles. La localización de una determinada evidencia se asiste a menudo con el uso de una fuente de luz forense, que permite la utilización de diversas longitudes de onda y diversos filtros para detectar la fluorescencia típica de los fluidos orgánicos.

a) MUESTRAS DE SANGRE

a.1 Composición:

Los componentes mayoritarios en tejido sanguíneo son los eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíe) y los leucocitos (glóbulos blancos). Los primeros son células maduras especializadas en el transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina. Su citoplasma está ocupado totalmente por esta proteína de transporte y por ello son células que han perdido el núcleo y los orgánulos celulares. No presentan núcleo y por tanto no contienen ADN nuclear. Sin embargo, la sangre resulta ser una adecuada fuente de ADN por encontrarse en ella, aunque en menor número otras células nucleadas, los leucocitos. De este tipo es de dónde lograremos extraer el ADN de las muestras de sangre. La cantidad estimada de ADN en sangre completa es de 30-60 µg/mL (Kobilinsky, 1992).

a.2 Ubicación:

El hallazgo de sangre en manchas obtenidas en las escenas de las investigaciones forenses juega un papel fundamental en la resolución de los casos criminales. Además de la identificación de sangre proveniente de un ser humano se puede tipificar el grupo sanguíneo al que pertenece y posteriormente realizar análisis de ADN.

Los tipos de soporte más comunes sobre los que se presenta: ropas, armas, uñas, en el lugar de los hechos (tierra, suelo, piedras, paredes y alfombras).

a.3 Muestreo:

La sangre se puede encontrar en diferentes estados: líquida o en forma de mancha. El aspecto de las manchas de sangre varía con la antigüedad y el soporte sobre el que se encuentran. Como norma general, cuanto más antigua es una mancha de sangre más oscura en su color, pero siempre son las condiciones ambientales (microclima), las que determinan el aspecto de la mancha. Las condiciones de envío de las muestras de sangre varían según el estado en que se encuentra.

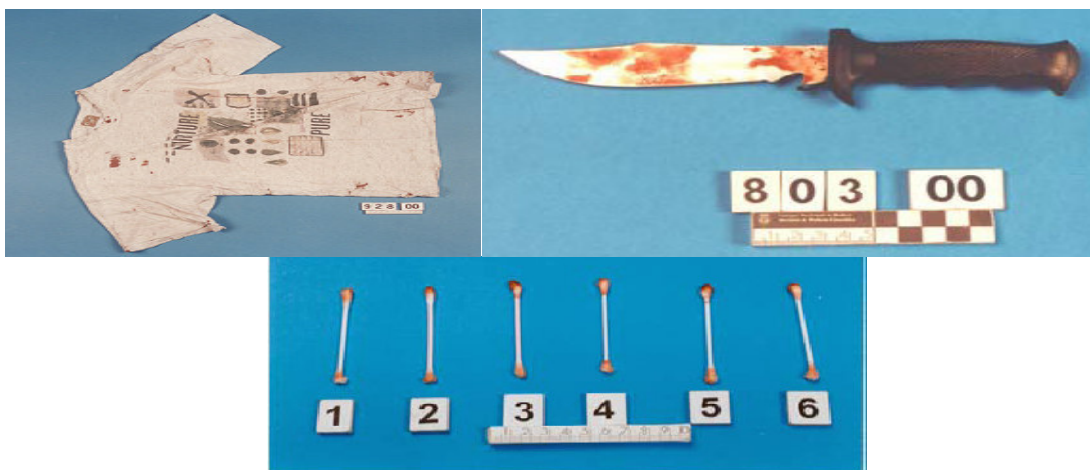


Figura 11: Manchas de sangre: izquierda arriba: Prenda con diversas manchas de sangre; derecha arriba: cuchillo con diversas manchas de sangre en mango y hoja; abajo: hisopos impregnados en suero y utilizados para recoger muestras de sangre.

a.4 Pruebas presuntivas:

Poner de manifiesto las peroxidases de la sangre. Las peroxidases son enzimas que tiene la sangre y su función es catalizar la descomposición del agua oxigenada.

a.4.1 Reactivos más conocidos y más utilizados:

- *Reacción de Adler o de la bencidina:* la mancha problema más unas gotitas de agua oxigenada, es positiva adquiere un color verde-azulado.
- *Reacción de kastle-Meyer o de la fenolftaleína:* solución acuosa de fenolftaleína y potasa a la que se añade cinc metálico y se cubre con una capa de parafina líquida para evitar su oxidación. Se macera con amoníaco diluido y se añaden gotas del reactivo de agua oxigenada, si es positiva se volverá de color rosa. El reactivo es sensible a la luz y al oxígeno atmosférico.
- *Reacción de Thevenon-roland o del piramidón:* Disolución etanólica de piramidón se macera en ácido acético concentrado, se añade el reactivo de piramidón y unas gotas de agua oxigenada, siendo positiva es de color violeta.

Existen muchas pruebas presuntivas para sangre enfocadas en la detección de moléculas de hemoglobina, las cuales son encontradas en los glóbulos rojos y usados como transportadores de oxígeno y dióxido de carbono. El *luminol* es usado como otra prueba presuntiva para la identificación de sangre, este puede usarse para localizar trazas de sangre que han sido diluidas más de 10 millones de veces. Se ha demostrado que el uso del luminol no inhibe ninguna prueba que se le realice a la muestra para ADN.

a.5 Pruebas confirmativas:

Para determinar si la sangre es humana o animal. Se puede clasificar en 4 pruebas:

- *Pruebas histológicas:* poner de manifiesto las células sanguíneas a través del microscopio óptico.

- *Pruebas cristalográficas o microquímicas:* Obtener sustancias derivadas de la hemoglobina, que forman unos cristales característicos visibles con el microscopio óptico. Técnica sencilla. Cristales más importantes:

- *∞* Cristales de hematina: con el reactivo de Teichman (contienen do cloruro de sodio, bromuro de potasio, ioduro de potasio y ácido acético), se forman cristales clorhidrato de hematina también llamados Teichman son muy característicos su forma de prismas rómbicos, alargados y de color pardo oscuro. Se obtiene mayor número; si utilizamos reactivo Gabriel Bertrand.

También los cristales de yodhidrato de hematina que son prismas rómbicos de color muy oscuro que se obtienen con el reactivo de strzyzouski.

- *∞* Cristales de hemocromógeno: Normalmente suele emplearse la solución de Takayama, es una solución acuosa de sosa y glucosa a la que se añade piridina. Se obtienen cristales delgados, en formas de agujas de color amarillo–naranja. Las técnicas más empleadas son las basadas en la obtención de cristales de Teichman que es uno de los reactivos más estables.

- *Pruebas espectroscópicas:* se obtiene el espectro de absorción de la hemoglobina y de sus derivados. Las técnicas espectroscópicas no son tan empleadas.
- *Pruebas cromatográficas:* Técnicas utilizadas para separar sustancias. Para la sangre se suele utilizar la cromatografía en capa fina, o la cromatografía sobre papel. La posición de cada sustancia es característica de la misma y para ello se emplea el Rf, que es el cociente de dividir la distancia que ha recorrido el eluyente desde la primera aplicación entre la distancia que ha alcanzado la muestra.

Una simple prueba de inmunocromatografía para identificación de sangre humana es indispensable para el Diagnostico Abacus (West Hills, CA) como el **kit ABACard Hematrace**. Esta prueba tiene un límite de detección de hemoglobina de 0.07µg/mL y muestra especificidad para sangre humana, así como el soporte de tarjetas FTA para sangre, las cuales cambian de color para demostrar la presencia de sangre.

b) MUESTRAS DE SEMEN

b.1 Composición:

El esperma total recién emitido es un líquido cremoso, de color opalino que tiende a amarillo verdoso cuando pasa el tiempo y de olor típico. Consta de dos elementos distintos:

- (i) las células que proceden de los tubos seminíferos del testículo
- (ii) el plasma seminal que procede del epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas de Cowper.

El espermatozoide es una célula que posee un flagelo para poder moverse a través del aparato genital interno femenino y alcanzar el óvulo. Por tanto, la función del espermatozoide es producir la fecundación del óvulo para perpetuar la especie. Para formar un nuevo ser, es necesario que se transmita toda la información genética que poseen los seres progenitores. Los espermatozoides contienen un gran núcleo cargado del ADN poseedor de dicha información, por lo que son un tipo celular idóneo para el estudio de polimorfismos genéticos. La cantidad de ADN estimada en semen es de 480 µg/mL (Baechtel, 1989), como vemos mucho mayor que la cantidad de ADN en sangre. A diferencia del resto de las células de nuestro organismo, cada espermatozoide (y en su caso los óvulos) presenta una sola copia de ADN (haploidismo), mientras que el resto de células son diploides pues presentan dos copias (la heredada del padre y la heredada de la madre).

El componente celular más abundante en el semen es el espermatozoide y el plasma seminal sirve como soporte, vehículo y medio nutritivo y de estabilización al espermatozoide. El eyaculado normal es de 2 a 6 mL, conteniendo unos 100 millones de células por mililitro en individuos normospermos (estado normal de los espermatozoides, normales en cantidad y calidad). Existe una gran variabilidad en estos datos no sólo entre individuos, sino también dentro del mismo individuo, según la edad entre otras situaciones. Además de los espermatozoides, en el semen podemos encontrar otros elementos tales como leucocitos y células epiteliales del tracto urinario aunque en número mucho menor.

En un individuo normospermo podemos esperar unos 450 μg de ADN/mL de eyaculado, en un individuo azoospermico (trastorno orgánico en el cual no se tiene un nivel medible de espermios en el semen, hay bajos niveles de fertilidad) esperamos unos 30 μg , esto es, sólo un 6,3% del normal. Otros rasgos característicos del semen son su pH básico (8.3) y su capacidad de fluorescer en la región visible del espectro cuando es irradiado con luz ultravioleta.

b.2 Ubicación:

La búsqueda sobre la víctima y el agresor son fundamentales en este caso, debiendo tomarse muestras en el canal vaginal, recto y faringe de la víctima (según el tipo de agresión) así como realizar una inspección de las ropas de la víctima y del agresor, especialmente de la ropa interior.



Figura 12. Muestras de Semen en ropa.

b.3 Muestreo:

La importancia de las manchas de espermio en el campo de la Genética Forense resulta evidente por ser pruebas indiciarias fundamentales en los delitos sexuales. Son después de las manchas de sangre el indicio biológico que con más frecuencia se envía para su estudio al laboratorio forense.

Las muestras de espermio que llegan al Laboratorio de Genética Forense son de varios tipos:

*** *Torundas / hisopos de toma de muestras vaginales y lavados vaginales:***

Estos tipos de muestras suelen ser recogidas de la víctima bien en un centro sanitario o bien por parte del forense una vez denunciada la agresión.

Las torundas o hisopos deben guardarse en fundas que no contengan ningún medio conservante y se remitirán al Laboratorio inmediatamente. El lavado vaginal debe realizarse con 10 mL. de suero fisiológico y tiene como finalidad asegurar al máximo la extracción de los posibles restos de semen. Ambos tipos de muestras estarán perfectamente etiquetadas y se enviarán refrigeradas.

*** Manchas de semen:**

Las manchas de espermatozoides producidas durante una agresión sexual suelen localizarse en las prendas que la víctima portaba en el momento de la agresión (ropa interior, medias, pañuelo con el que posiblemente se limpiara la persona agredida, etc.). Como en el caso de las manchas de sangre, estos efectos deben enviarse completos, perfectamente etiquetados, secos y en bolsas de papel independientes. Se procurará manipular lo menos posible la muestra para evitar estropearla.

Si la tela sobre la cual se asienta la mancha es blanca y absorbente, ésta es difícil de distinguir y hay que buscarla por transparencia y al tacto. A veces es necesaria la búsqueda con luz ultravioleta o con luz láser con las que se ve una fluorescencia característica. Si la tela es blanca no absorbente, las manchas toman aspecto de mapas, con bordes bien limitados y consistencia de almidón. Si la tela no es blanca resulta mucho más fácil encontrar las manchas a simple vista.

Las manchas de espermatozoides sobre la piel aparecen como pinceladas de barniz o laca; se detectan buscando sobre ángulos de reflexión de la luz. Sobre un objeto sólido o superficie pulida se forman costras brillantes, se debe permitir el secado para rasparlas con una espátula y enviar las costras al laboratorio.

Es deseable acompañar las muestras con un breve cuestionario donde figuren datos como el tipo de agresión (vaginal, anal, oral, eyaculación externa), el número de agresores, si éstos usaron preservativos, si la víctima se lavó después de la agresión, si tenía la menstruación o si ha tenido algún coito consentido en las últimas 72 horas. Además es conveniente enviar también **muestra biológica indubitada de la víctima** con su consentimiento y del agresor, si existe sospechoso, para cotejar los resultados obtenidos.

Lo normal es que las manchas de semen se encuentren mezcladas con flujo vaginal, aunque también a veces se encuentran contaminadas por orina, heces u otras sustancias diversas debido a las prácticas que con relativa frecuencia se asocian a este tipo de delitos.

b.4 Pruebas presuntivas:

Como tal las pruebas presuntivas son muy sencillas, ya que las muestras de semen se identifican fácilmente, por ejemplo:

- Si la tela sobre la cual se asienta la mancha es blanca y absorbente, ésta es difícil de distinguir y hay que buscarla por transparencia y al tacto.
- A veces es necesaria la búsqueda con luz ultravioleta o con luz láser con las que se ve una fluorescencia característica. Si la tela es blanca no absorbente, las manchas toman aspecto de mapas, con bordes bien limitados y consistencia de almidón.
- Si la tela no es blanca resulta mucho más fácil encontrar las manchas a simple vista.
- Las manchas de esperma sobre la piel aparecen como pinceladas de barniz o laca; se detectan buscando sobre ángulos de reflexión de la luz.
- Sobre un objeto sólido o superficie pulida se forman costras brillantes se debe permitir que se sequen para rasparlas con una espátula y enviar las costras al laboratorio.

b.5 Pruebas confirmativas:

Las técnicas de confirmación implican la observación de espermatozoides en preparaciones microscópicas realizadas a partir de las muestras a analizar.

Actualmente existe el kit ABACard P30 el cual resalta la presencia característica de altas concentraciones de fosfatasa ácida y de una proteína específica (proteína P30 ó PSA) serán rasgos que se utilicen en el diagnóstico confirmativo en la investigación de restos de semen.

c) MUESTRAS DE SALIVA

c.1 Composición:

La secreción salival del hombre varía entre 1 y 1,5 litros diarios. Tiene una función lubricante y facilitadora de la masticación y la deglución; asimismo posee una función enzimática desdoblado los glúcidos (amilasa).

Durante la noche casi deja de segregarse. La saliva en sí, no es un fluido que contenga componente celular y por ello carece por sí misma de ADN; pero se encuentra en un medio lleno de células epiteliales (epitelio bucal). Estas células se desprenden continuamente y llegan a formar parte de la saliva. Así, un chicle puede contener células del epitelio bucal que son nucleadas y por tanto contienen ADN; en un filtro de cigarrillo nos podemos encontrar células adheridas a él que se han desprendido del epitelio labial.

c.2 Ubicación:

Las muestras de saliva suelen presentarse en su mayoría en forma de manchas. Se asientan normalmente sobre filtros de cigarrillo, chicles, cepillos de dientes, sobres y sellos. También se encuentra sobre vasos y latas de bebida; o en pasamontañas, medias o mascarillas utilizadas en robos con la finalidad de ocultar el rostro.



Figura 13. Muestras de Saliva.

c.3 Muestreo:

Las muestras de saliva en forma de manchas, ubicada sobre filtros de cigarrillo, chicles, cepillos de dientes, sobres y sellos. Se debe manipular con pinzas evitando en todo momento el contacto directo con las manos.

Si se asienta sobre vasos y latas de bebida; en este caso se ha de muestrear la muestra, pasando por la zona donde presumiblemente se apoyaron los labios un hisopo impregnado en suero salino, como si se tratase de una muestra de sangre.

También es frecuente el análisis en pasamontañas, medias o mascarillas utilizadas en atracos y robos con la finalidad de ocultar el rostro, recortándose, en estos casos, la zona que aproximadamente coincide con la boca para proceder a su estudio.

En muestras como sobres y sellos es frecuente que sea necesario otro tipo de estudio y que dichas muestras tengan que ser analizadas en varios departamentos (análisis lofoscópico para el estudio de huellas o análisis documentoscópico para el estudio de las zonas escritas del sobre). Por ello es imprescindible en este tipo de muestras señalar claramente el tipo de estudios que se requiere.

En caso de varias muestras se deberán enviar **separadas**; por ejemplo, los filtros que hay en un cenicero se deben mandar uno a uno, en sobres separados, y prescindiendo de los restos de ceniza que puedan quedar en el cenicero.

Hoy en día es cada vez más frecuente el muestreo de saliva en un hisopo como muestra biológica indubitada (de referencia) pues, en contraposición con la extracción de sangre, resulta un método no invasivo, no doloroso y además se evita el peligro de vertido o rotura de los tubos de sangre líquida tradicionales. Para su muestreo, se frota el hisopo limpio de algodón contra la cara interna de las mejillas con el fin de arrastrar el mayor número de células del epitelio bucal.



Figura 14. Esquema del muestreo de la muestra indubitada.

Posteriormente se deja secar el hisopo a temperatura ambiente sin que incida directamente la luz solar sobre él y una vez seco puede introducirse en una caja de cartón o sobre de papel (Figura 14). Este tipo de muestras no necesita refrigeración, lo cual es un motivo más para preferir su uso en lugar de las muestras de sangre. Como en los casos anteriores los hisopos de saliva deben ir acompañados de etiquetas identificativas.

c.4 Pruebas presuntivas:

Acompañando a la saliva, se encuentran las células descamadas del epitelio bucal que serán el sustrato para la extracción de ADN en estos restos. Las amilasas se encuentran también en animales (tipo alfa-amilasas) y en plantas (tipo beta-amilasas).

c.5 Pruebas confirmativas:

Para la confirmación de presencia de restos de saliva deberán observarse células del epitelio bucal en los extractos de las muestras. Los soportes más comunes son colillas, sellos, sobres, mordeduras, manchas en ropa, chicles y vasos.

Actualmente existen kits un ejemplo de ellos es SALlgAE, encargado de la identificación; así como el soporte de tarjetas FTA para salivas, las cuales cambian de color para demostrar la presencia de saliva y estas se fundamentan en la enzima amilasa.

d) MUESTRAS DE CÉLULAS DE DESCAMACIÓN

d.1 Composición:

Se trata de muestras forenses producidas por el rozamiento de distintas partes de cuerpo con prendas u objetos, por lo que en la mayoría de las ocasiones están formadas por células de descamación del tejido epitelial. En ocasiones puede ser interesante en la práctica forense saber quién ha utilizado una prenda o quién empuñó un cuchillo.

d.2 Ubicación:

El simple roce de la piel con el cuello de una camisa por ejemplo hace que se desprendan células epiteliales nucleadas que quedan adheridas a la prenda en cuestión permitiendo así su identificación. Las prendas de vestir u objetos que estén en contacto con el cuerpo humano (cuello, puños, axilas, el interior de la parte delantera de la gorra, fluidos vaginales, etc.), pondrán tener este tipo de células de descamación.

d.3 Muestreo:

Normalmente se enviará completa la prenda u objeto susceptible de análisis. Una vez en el laboratorio será el perito el que decida de qué zona tomar la muestra (cuello, puños, axilas, el interior de la parte delantera en el caso de una gorra, etc.).

Se trata de muestras muy críticas, pues se parte de unas pocas células para el análisis y la cantidad de ADN que se puede extraer a partir de una prenda sin manchas aparentes es mínima; la reacción de PCR se desarrolla a partir de un bajo número de copias de ADN (Low Copy Number, LCN) y los resultados han de interpretarse con especial cuidado (Gill y cols., 2000; Whitaker y cols., 2001).

Por ello se trata de un tipo de muestras que se han de manipular de manera excepcional, por lo que se debe usar guantes y mascarilla para evitar contaminaciones.

d.4 Pruebas presuntivas:

La observación de pequeñas partículas de piel que podrán estar en algún tipo de ropa u objeto que posiblemente haya estado en contacto con el presunto delincuente; así como la toma de muestras de fluido vaginal, ya que contiene células.

d.5 Pruebas confirmativas:

Las células del epitelio vaginal sintetizan glucógeno bajo la acción de los estrógenos. La identificación de estos restos se basa en esta particularidad (Reacción de PAS (+) Periodic Acid-Schiff) así como en la presencia de flora bacteriana característica (bacilos de Döderleinque, siendo bacterias que normalmente viven en la vagina y mantienen en este órgano el pH ácido, lo cual evita infecciones). Estas células no son exclusivas del epitelio vaginal ya que se encuentran también en menor cantidad en la boca y en el tracto uretral de hombres (en concreto en la fosa navicular). Por tanto, el hallazgo de unas pocas células puede ser comprometido, hecho que se da a veces cuando se solicita la localización de células procedentes del epitelio vaginal en un hisopo penil.

e) MUESTRAS DE PELO

e.1 Composición:

El pelo es una formación queratinizante derivada de la epidermis. Está formado por un extremo libre y por una raíz que termina en un ensanchamiento (bulbo) implantado en la dermis. La estructura íntima del pelo está formada por tres capas concéntricas:

- La **cutícula** es una envoltura formada por un número variable de capas de células dependiendo del grosor del pelo.
- La **corteza** está formada por células corticales que contienen macrofibrillas de queratina y gránulos de melanina. Esta capa constituye la mayor parte del pelo y contribuye principalmente a establecer las propiedades mecánicas de éste.
- La **médula** representa la parte central y puede ser continua, discontinua o inexistente. Está formada por una trama de queratina esponjosa en la que se sustentan laminillas de material amorfo que llenan los espacios vacíos.

Los pelos son estructuras que muestran diferente composición según la zona que estudiemos. Se trata de un tejido vivo que se va queratinizando a medida que crece. La parte más alejada del cuero cabelludo está formada por células que tienen ocupado su citoplasma totalmente por una proteína estructural llamada queratina que da su forma al pelo. Por tanto, en esta zona distal, las células carecen de núcleo y de ADN. Sin embargo, en la zona proximal (bulbo o raíz), el pelo presenta células nucleadas totalmente activas que contienen ADN. Es imprescindible que los pelos encontrados en la escena del crimen presenten bulbo si lo que queremos es realizar un estudio de ADN nuclear.

Pero no todos los pelos con bulbo son susceptibles de análisis de ADN nuclear, por lo que es necesario realizar una selección previa a la analítica molecular, simplemente visualizándolos al microscopio. Dentro del conjunto de pelos que tengan bulbo existen algunos que son mejores que otros para los estudios de ADN. Los pelos que aún se encuentran en fase de crecimiento presentan bulbo activo rico en células y por ello son idóneos para los estudios de ADN. Los pelos caducos no presentan tal actividad y por ello no se obtienen resultados positivos en los análisis.

Se pueden diferenciar tres fases en la vida de un pelo:

- Anagénica: fase de crecimiento y elevada actividad celular
- Catagénica: fase de madurez con moderada actividad celular
- Telogénica: fase terminal sin actividad celular

Lógicamente, los pelos idóneos para el análisis de ADN son los anagénicos, seguidos de los catagénicos. Como norma general, los telogénicos se desecharán si se pretende realizar un estudio de ADN nuclear, pero no si el estudio es de ADN mitocondrial.

El pelo **anagénico** que puede aparecer en la escena de un crimen normalmente ha sido arrancado. Es fácil identificarlos con el microscopio pues presentan bulbo en forma de cuchara, o de botón o de abanico; muchas veces el bulbo está retorcido y la zona del tallo próxima a él presenta una cubierta epitelial (manguito), siendo la fase de crecimiento activo del pelo, en ella las células del folículo se multiplican por mitosis y forman el pelo al queratinizarse completamente. Un cabello humano crece a un ritmo aproximado de 0.35 mm por día.

El pelo **telogénico** puede haber sido arrancado, pero lo normal es que se caiga espontáneamente. Presenta bulbo en forma de palillo de tambor y no suele parecer la cubierta epitelial, siendo la fase donde ha cesado la actividad del folículo.

Finalmente, el pelo **catagénico** presenta un estadio intermedio entre el primero y el segundo siendo la fase de transición entre el estado de crecimiento activo y el estado de no crecimiento. Es difícil discriminar qué pelos en estado catagénico darán resultados positivos en la extracción de ADN y cuáles no lo harán; por ello, recomendamos que se intente la analítica de ADN en todos ellos,

Una cabeza humana tiene aproximadamente entre 100,000 y 150,000 folículos pilosos, de los cuales entre el 80 y el 90% estarán en fase anágena y entre el 10 y el 20% en fase catágena o telógena.



Figura 15. Muestra de pelo.

e.2 Ubicación y Muestreo:

En la escena del crimen puede haber pelos del criminal o de la víctima, pero también de curiosos que contaminaron el lugar de los hechos. Por ello hay que ser rigurosos a la hora de elegir qué pelos se enviarán al Laboratorio, pues no todos los pelos presentes en el lugar de los hechos tienen la misma importancia.

La manipulación del material se realizará con el máximo cuidado, preferentemente se usarán guantes y se evitarán las pinzas, pues pueden ocasionar la fragmentación del pelo. Dichas muestras pueden enviarse en bolsas de plástico herméticamente cerradas, en frascos de cristal o en los típicos frascos de toma de muestra de orina, como siempre etiquetados.

e.3 Pruebas presuntivas:

Observar el lugar de los hechos, para encontrar pelos de humano, se identifican por características específicas del pelo humano; además de tomar una muestra control de la víctima preferentemente los pelos deben de ser arrancados, para asegurar que conservan su bulbo y raíz.

e.4 Pruebas confirmativas:

Las pruebas se realizaran directamente en el laboratorio y estas son la secuencia del respectivo análisis de ADN.

f) MUESTRAS DE TEJIDO

f.1 Composición:

Como norma general, cualquier tejido que contenga células nucleadas es una fuente adecuada para estudio de ADN. Sin embargo sí conviene tener en cuenta que existen unos tejidos mejores que otros.

f.2 Ubicación y Muestreo:

Este tipo de evidencias llega al Laboratorio de manera menos frecuente que las anteriores. Se trata de muestras relacionadas sobre todo con la identificación de cadáveres. Hay ocasiones en las que no aparece un cadáver hasta que no han transcurrido varios días desde la muerte y no disponemos de sangre líquida de la cavidad cardiaca en perfecto estado, pues ya han dado comienzo los procesos de putrefacción.

Sin embargo, pueden conservarse aún algunos órganos como el bazo y el hígado. En este caso se puede recurrir a dichos órganos para la identificación genética. Es suficiente el envío de 10-15 g. de dichos órganos teniendo en cuenta que la muestra se debe tomar de las zonas que no han sido afectadas por agentes externos o por el calor en el caso de cadáveres calcinados. Las muestras se enviarán en frascos limpios, secos, perfectamente etiquetados y si es posible, en condiciones de refrigeración (4-8°C). Estos tipos de muestras destinadas al estudio biológico nunca deben ser fijadas con formol (Figura 16).

También se puede recurrir a la toma de muestras del músculo esquelético de las zonas más preservadas de la putrefacción. Este tipo de tejido está formado por células musculares polinucleadas. Los núcleos son ovoideos y se disponen en la parte periférica de la célula, pues la mayor parte del espacio celular está ocupado por miofibrillas contráctiles de actina y miosina. Será suficiente con 10-20 g de músculo, pero preferiblemente se tomarán muestras de dos regiones distintas. Las condiciones de envío son las mismas que las ya vistas para bazo o hígado.



Figura 16. Tejido muscular: izquierda: músculo esquelético enviado en formol: centro y derecha: músculo esquelético de un cadáver calcinado.

f.3 Pruebas presuntivas:

Para la identificación de cadáveres se puede utilizar como muestra de referencia tejido en preparaciones histológicas normalmente almacenadas en los hospitales si la víctima fue sometida a algún estudio médico antes de su muerte.

Una de las fuentes de contaminación más frecuentes son los ADNs de origen bacteriano que proliferan en estos tejidos. Además, la incapacidad de extraer ADN a partir de tejidos blandos cuando el período post-mortem es muy largo se debe a que el ADN de dichos tejidos puede degradarse de tal manera que no será lo suficientemente largo ni siquiera para un análisis PCR (Sajantila y cols., 1991). Se ha demostrado que el ADN es bastante más estable en el hueso compacto (Hochmeister y cols., 1991) y por ello es preferible recurrir a este tipo de muestras en la identificación de cadáveres, a pesar de que la extracción convencional de ADN en hueso es bastante más laboriosa que en tejido blando.

f.4 Pruebas confirmativas:

Las pruebas se realizarán directamente en el laboratorio y estas son la secuencia del respectivo análisis de ADN.

g) UÑAS

g.1 Composición:

Contienen una proteína fibrosa muy resistente denominada queratina. El crecimiento de las uñas se debe a la división de células en la base y en la cara interna del cuerpo de la uña. Estas células emigran hacia el exterior al tiempo que experimentan un proceso de diferenciación específico denominado queratinización consistente en un aumento gradual de su contenido en microfibrillas de queratina, y la reabsorción del núcleo y de los orgánulos celulares. Por ello es lógico pensar que las uñas no contendrán una carga importante de ADN, sin embargo, en la práctica, dan mejores resultados de lo esperado. Existen protocolos de extracción de ADN específicos para este tipo de muestras (Pötsch y cols., 1994), pero la extracción convencional mediante Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico ofrece también buenos resultados.

g.2 Ubicación y Muestreo:

Las uñas pueden interesarnos fundamentalmente por dos motivos: como muestra biológica indubitada para la identificación cadavérica (analizando la propia uña) o como lugar de búsqueda de restos biológicos (como defensa de la víctima) (Figura 17). En este último caso se tomará muestra de la uña raspando en su zona distal y se prescindirá del análisis de la propia uña; los restos biológicos serán mínimos, por lo tanto la cantidad de ADN; por ello estas muestras han de considerarse críticas.

En el caso de la identificación cadavérica la uña se limpiará y se procesarán recortes de la misma.

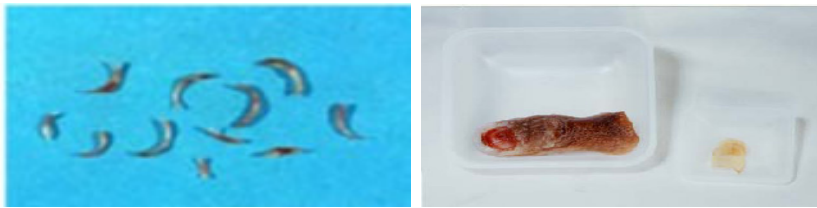


Figura 17. Uñas: izquierda uñas de víctima con restos de sangre del presunto autor; derecha: uña sometida a una solución de amoníaco para intentar la regeneración del pulpejo para identificación mediante necrorreseña que finalmente se identificó mediante polimorfismos de ADN.

g.3 Pruebas presuntivas:

Observar el lugar de los hechos, para encontrar uñas que puedan tener restos de sangre o células de descamación del presunto autor.

g.4 Pruebas confirmativas:

Una excoiación leve en la piel, cuyas señales desaparezcan a las 24 horas, puede dejar restos epidérmicos en las uñas suficientes para obtener un perfil de ADN por PCR.

h) RESTOS ÓSEOS

h.1 Composición:

Cuando un cadáver se encuentra en avanzado estado de putrefacción o ya en su fase de esqueletización, no se ha perdido por completo la materia orgánica. El tejido óseo está compuesto por (Ham, 1975):

1.- **Substancia intercelular**, con dos componentes fundamentalmente distintos, uno es inorgánico (sales de calcio precipitadas, fundamentalmente bajo la forma de cristales de hidroxiapatita) y el otro orgánico (fundamentalmente colágeno, mucopolisacáridos sulfatados y algunas glucoproteínas). Los estudios del hueso calcificado han demostrado que, por peso seco, el 76-77% de la sustancia ósea es inorgánica y el resto orgánica.

2.- **Células óseas:** osteocitos y osteoblastos, rodeadas por la substancia intercelular. Así, la parte celular del tejido óseo queda encerrada en lagunas pero con capacidad para nutrirse a través de pequeños conductos denominados canalículos. Tanto osteocitos como osteoblastos son células nucleadas y su número oscila entre 20.000 y 26.000 por mm^3 en el hueso compacto (Frost, 1960). Al tratarse de células nucleadas contienen ADN que perdura dentro de la célula.

De entre todos los huesos hay unos que interesan más que otros: aquellos en los que durante la vida del individuo ha habido una mayor actividad celular, son más ricos en ADN. Este es el caso de los huesos en los que se desarrolla la hematopoyesis o generación de células sanguíneas, ricos en médula ósea. En el adulto existen dos tipos de médula ósea: la roja y la amarilla:

- La **médula roja** debe su color al gran número de glóbulos rojos que contiene, en diversas etapas de su desarrollo. Así pues, la médula roja es la que produce activamente glóbulos sanguíneos.
- La **médula amarilla** debe su color a la gran cantidad de grasa que contiene. Aunque la médula amarilla conserva en potencia la capacidad de producir glóbulos rojos, el hecho de no tener color rojo indica que no trabaja activamente en ello; el hecho de tener color amarillo señala que está dedicada a la tarea menos laboriosa de almacenar grasa.

Los huesos con abundante médula como un fémur, una tibia, un húmero, un esternón o una costilla (Figura 18) son preferibles a una falange. Sin embargo no hemos de olvidar que la degradación del ADN en la médula ósea es mucho más rápida que en la matriz ósea (Perry y cols., 1988). Por este motivo es recomendable realizar la extracción de ADN de cadáveres antiguos o muy estropeados a partir del tejido óseo compacto por encontrarse en este lugar más protegido el ADN. En nuestra experiencia, en los cadáveres que aún conservan partes blandas pero éstas se encuentran en avanzado estado de putrefacción se pueden utilizar huesos como esternón o costilla (Figura 18, izquierda y centro) y en los cadáveres ya práctica o totalmente esqueletizados es recomendable el uso de huesos largos (Figura 18, derecha) para la identificación genética.

h.2 Ubicación y Muestreo:

Estos tipos de muestras suelen estar relacionadas con la identificación de cadáveres. En la toma de muestras se procurarán manipularlas lo menos posible, llevar siempre guantes y empaquetarlas lo más próximo a la esterilidad. Hay que tener presente que, ya que la contaminación del medio está en la superficie del hueso, en el Laboratorio manejaremos probablemente la parte interior. Por eso es importante no cortar el hueso para su transporte y así mantener protegida la zona interior.



Figura 18. Cadáveres identificados a partir de ADN presente en restos óseos: izquierda: del esternón; centro: de una costilla; derecha: del fémur.

h.3 Pruebas presuntivas:

Identificar el cadáver.

h.4 Pruebas confirmativas:

Las pruebas se realizarán directamente en el laboratorio y estas son la secuencia del respectivo análisis de ADN.

i) DIENTES

i.1 Composición:

Los dientes ofrecen una estupenda fuente de ADN. La **corona** anatómica del diente está recubierta por un tejido inerte, duro y acelular denominado **esmalte**. Este es el tejido más altamente mineralizado que existe en el organismo: un 96% de contenido inorgánico (hidroxiapatita como en el caso de los huesos) y un 4% de material orgánico y agua.

Las **raíces dentarias** están cubiertas por el **cemento** que es un tejido conectivo duro mineralizado también por cristales de hidroxiapatita (50%) y también formado por colágeno. Existen células asociadas al cemento llamadas cementoblastos y cementocitos. De forma similar a los osteoblastos, los cementoblastos se encargan de formar el propio cemento y van quedando atrapados en lagunas dentro de su propia matriz, denominándose entonces cementocitos.

Por debajo del esmalte en la corona y del cemento en las raíces, nos encontramos la **dentina**, otro tejido conectivo compuesto por un 70% de material inorgánico (principalmente cristales de hidroxiapatita), un 20% de material orgánico (colágeno tipo I) y un 10% de agua. Dicha composición le confiere una dureza mayor que el hueso y menor que el esmalte. El componente celular está formado por odontoblastos cuya estimulación hace que depositen dentina.

Inmediatamente después se encuentra con la **cámara o cavidad pulpar**, en contacto con el exterior por el foramen apical situado en la porción radicular. Por este orificio los nervios y los vasos penetran en el diente de forma que permiten que el diente sea un tejido activo. Dentro de la cavidad pulpar se sitúa la **pulpa** que es un tejido conectivo blando rico en células (odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas, macrófagos y algunos linfocitos), vasos y nervios (Figura 19).

La mayor cantidad de células nucleadas (y por tanto de ADN) en el diente, se encuentra situada precisamente en la zona más interna de los dientes (pulpa), rodeadas por una dura matriz inorgánica que le proporciona una eficaz protección a todos los agentes externos químicos, físicos y biológicos. Si bien puede haber contaminantes en la superficie del diente, una vez limpia, se ha de proceder a la apertura de la pieza y a la observación del estado del tejido pulpar; si presenta signos aún de vitalidad se puede realizar una extracción de ADN sólo con ese tejido, pero si la cavidad pulpar está ya vacía o el tejido pulpar está en malas condiciones, se puede realizar una trituración a baja temperatura (-173 °C) de las partes duras del diente, pues pueden aportar ADN suficiente como para realizar un análisis en condiciones.

i.2 Ubicación y Muestreo:

A la hora de elegir qué tipo de dientes se analizarán, es aconsejable siempre el análisis en molares (enviar al menos cuatro) que no estén externamente dañados ni restaurados. En este tipo de piezas dentales es donde más cantidad de pulpa hay y por tanto más ADN para la identificación genética.

Si el diente está cariado o partido no existe verdadera protección de la zona interior y esto ocasionará problemas de contaminación en el Laboratorio. En el caso de no disponer de molares no cariados ni restaurados el orden de preferencia será el siguiente: premolares no dañados, caninos no dañados y finalmente incisivos no dañados. Para su envío deberán ser introducidos en papel o cartón limpios.

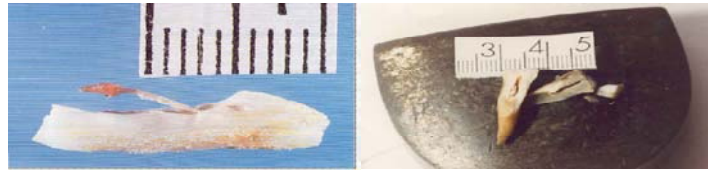


Figura 19. Pulpas dentales: izquierda: en buen estado; derecha: en mal estado.

A. INDICIOS MENOS FRECUENTES

A veces se solicita al laboratorio el análisis de restos que, aunque no son habituales, pueden aportar datos importantes a la investigación de un caso determinado. Entre estos restos podemos citar:

a) RESTOS DE ORINA

La identificación de la orina se basa en la detección de iones o compuestos orgánicos que se hallan más concentrados en orina que en otros fluidos fisiológicos, con menor concentración, tales como la urea o creatinina, también presentes en sudor, sangre, saliva. Contiene células epiteliales del tracto urinario, así como leucocitos y eritrocitos, muy diluidas en la orina, por lo que la esperanza de recuperar ADN a partir de manchas de orina es muy baja.

b) HECES

La identificación de restos fecales se basa en la presencia de pigmentos biliares y de restos alimenticios no digeridos. Son un pésimo sustrato para la extracción de ADN. No es posible el estudio de ADN nuclear en estos restos debido a la extrema degradación y a su contaminación natural (aproximadamente la tercera parte del peso seco de las heces son bacterias). Sin embargo, se han conseguido resultados en ADN mitocondrial, en concreto la región HV1, partiendo de 10 mg de heces frescas.

XI. PROBLEMÁTICA DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Ya hemos visto que, actualmente, para determinar a qué individuo pertenece una muestra biológica, se recurre al estudio de sus polimorfismos de ADN, se cree conveniente apuntar la problemática del día a día del laboratorio en las diferentes etapas del análisis de estos polimorfismos.

Las muestras indubitadas que pertenecen a individuos vivos no suelen dar problemas en el análisis genético si fueron muestreadas y enviadas al laboratorio en condiciones óptimas. Sin embargo, las evidencias con carácter dubitado pueden sufrir una serie de modificaciones que dependerán no sólo del tiempo transcurrido hasta el momento de su estudio, sino de las condiciones ambientales a las cuales se vieron sometidas, de la cantidad de muestra, del soporte en el cual se encuentran, del lugar de procedencia y del tipo de muestra biológica.

De todos los tipos de muestras biológicas que se analizan diariamente en el laboratorio forense, quizá sean las de sangre las más sencillas de tratar. Sin embargo algunas veces también dan problemas. La **sangre** podemos hallarla bien en estado líquido o en forma de mancha. La sangre líquida bien conservada no ofrece ningún tipo de problema, pero no es raro que al laboratorio llegue sangre putrefacta por descomposición. Para evitar el primer problema es conveniente realizar una mancha sobre una gasa antes de proceder al transporte de la muestra y para el segundo no queda más remedio que tratar de buscar otra muestra para el análisis, bien sea un tejido blando, uñas, o un resto óseo, dependiendo del estado de conservación del cuerpo. La sangre en forma de mancha se conserva más fácilmente y puede analizarse tras varios años si las condiciones de secado fueron adecuadas.

Quizá las manchas sobre cueros, maderas tratadas, restos vegetales y tierras sean de las más críticas pues estos materiales tienen diferentes grados de absorción y en ellos se encuentran presentes gran cantidad de inhibidores de la PCR como los taninos, que impiden que la reacción funcione.

Las muestras de **saliva** no suelen presentar problemas en la analítica de ADN. Suelen llegar al laboratorio en forma de mancha, sobre filtros de cigarrillo, sellos, chicles o prendas (por ejemplo la zona coincidente con la boca en un pasamontañas utilizado en un robo) o bien en soportes más engorrosos como vasos, botellas o huesos de fruta.

En las muestras de **semen** de casos de agresiones sexuales, el principal problema es que además de los espermatozoides del agresor se suele encontrar presente otro tipo celular procedente de la víctima, las células del epitelio vaginal. Por ello, al analizar estas muestras se encontrará una mezcla de perfiles genéticos. Es de gran ayuda disponer de una muestra indubitada de la víctima con el fin de identificar qué alelos pueden proceder de la víctima en la mezcla evidenciada.

El análisis de ADN a partir de muestras de **pelos** es más delicado, ya que estas muestras requieren un análisis microscópico previo a la analítica molecular con el fin de determinar el tipo de análisis que es posible en ellos (estudios de ADN nuclear o de ADN mitocondrial) además de otras características importantes. Con el análisis microscópico se determinan, entre otros, los siguientes puntos:

- Si se trata de pelos de origen animal o humano.
- Si se trata de pelos completos (con bulbo) o de fragmentos de pelos (sin bulbo).
 - En el caso de fragmentos de pelos los estudios a realizar son los de ADN mitocondrial como veremos en el siguiente apartado.
 - En el caso de los pelos con bulbo se puede determinar en qué fase vital se encuentra éste. En los pelos con bulbo telogénico (en fase de caída) se suele realizar análisis de ADN mitocondrial y en los pelos con raíz anagénica (en fase de crecimiento) se puede realizar un análisis de ADN nuclear.
- Visualizar el grado de suciedad que presentan los pelos y si aparecen restos de posible sangre adheridos a los mismos. En el caso de presentar sangre se procede a la separación de ambos tipos de restos biológicos para su análisis por separado, pues puede tratarse de muestras pertenecientes a diferentes personas.

Las **uñas** son muestras muy sencillas de analizar, pues suele dar resultados positivos en la mayoría de los casos. Estas pueden ser importantes por dos motivos: como muestra biológica indubitada para la identificación cadavérica (analizando la propia uña) cuando no es posible una identificación por métodos no genéticos, o como lugar de búsqueda de restos biológicos, siendo un medio de defensa para la víctima.

Las muestras de **tejidos** también suelen estar relacionadas sobre todo con la identificación de cadáveres en los que han comenzado los procesos de putrefacción. Los mejores resultados se obtienen con músculo esquelético tomado de las zonas que se encuentren más preservadas de la putrefacción.

Los cadáveres ya esqueletizados en los que la única muestra disponible son los **huesos** y los **dientes** son los más problemáticos en cuanto a su identificación genética. Normalmente, los huesos largos (fémur o húmero) y los molares (muelas) son las muestras que ofrecen mejores resultados, ya que contienen mayor cantidad de médula ósea.

La extracción de ADN a partir de este tipo de restos es más larga y costosa que en los casos anteriores, aunque actualmente existen kits específicos para este tipo de muestras, un ejemplo sería el DNA tissue de Qiagen®, entre otros como los de la marca Applied Biosystems®, por mencionar algunos.

XII. MARCADORES GENÉTICOS DE INTERÉS FORENSE

Todos los individuos de la especie humana son idénticos entre sí en un 99,98% de su ADN y sólo en el 0,02% restante (~600 000 nucleótidos) residen las diferencias entre unos y otros y que nos hacen un ser único (salvo en el caso de gemelos univitelinos que son genéticamente idénticos). Dentro de esta pequeña proporción de ADN distintivo existen regiones hipervariables o polimórficas que son las que nos permiten usar la información genética con fines de identificación. Es importante mencionar que la variabilidad genética entre individuos se concentra principalmente en el ADN no codificante y que, por tanto, de un análisis de individualización genética con fines forenses no puede extraerse ningún tipo de información sobre características fenotípicas (rasgos físicos, susceptibilidad a enfermedades o fármacos, etc.).

A. TIPOS DE *POLIMORFISMOS*

a) *de secuencia*, por el que los alelos de un mismo locus se diferencian en la base (A, C, G o T) presente en una o más posiciones concretas.

b) *de longitud*, los alelos de un locus se diferencian entre ellos por el número total de bases que lo componen. El polimorfismo de longitud es muy común en las secuencias repetidas en tándem, en las que el número total de unidades de repetición definen a cada alelo.

Las regiones de ADN nuclear con mayor interés en Genética Forense son los minisatélites o *VNTRs* («*Variable Number of Tandem Repeats*») y los microsatélites o *STRs* («*Short Tandem Repeats*»). A cada uno de estos loci o segmentos de ADN polimórfico se le denomina *marcador genético*. La principal diferencia entre ambos tipos de marcadores reside en la longitud total del segmento de ADN que, a su vez, viene determinada por el número de nucleótidos de la unidad de repetición que lo componen.

El tamaño total de un marcador VNTR oscila entre 500 y 10 000 nucleótidos, mientras que el de un STR varía entre 100 y 500 nucleótidos. Los diferentes alelos de un marcador VNTR o STR se distinguen por su tamaño que, en definitiva, viene dado por el número total de repeticiones en tándem.

B. ELECCIÓN DE POLIMORFISMOS A ESTUDIAR

El ADN nuclear está presente en todas las células del cuerpo humano (excepto en los eritrocitos, que carecen de núcleo), por lo que es posible extraerlo a partir de cualquier material biológico.

La selección de las muestras a analizar, su toma y recolección, identificación, conservación, custodia y transporte hasta el laboratorio son factores de vital trascendencia en cualquier análisis de ADN.

En el laboratorio se procede a la extracción del ADN a partir de la muestra a analizar siendo necesario ajustar el método de extracción a las particularidades de la muestra en cuestión. Tras la cuantificación de la cantidad de ADN presente en el extracto se procede a su individualización, que puede llevarse a cabo principalmente mediante dos tipos de análisis.

Como norma general diremos que siempre que sea posible se realizará el análisis de polimorfismos del *ADN nuclear*, pues son los que más información nos darán en cuanto a la identidad de la muestra. La decisión de seleccionar una región u otra del ADN nuclear está basada, en parte, en los resultados previos existentes que demuestren la eficacia de la reacción de PCR. Después de una extracción de ADN en muestras que se encuentran en muy mal estado de conservación, se obtienen fragmentos de sólo 100-200 nucleótidos 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 nucleótidos.

Uno de los fragmentos de ADN nuclear más estudiados es la *amelogenina*. Se trata de un marcador muy útil porque nos informa sobre el sexo del individuo al que pertenece la muestra dubitada.

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.

a) ADN mitocondrial

Presenta herencia materna y es más estable que el ADN cromosómico. Se suelen analizar dos regiones hipervariables del "lazo D". La aplicación de técnicas moleculares para estudiar los polimorfismos del ADNmt encuentra su justificación en los siguientes supuestos:

1. Cuando existe una gran degradación de las muestras enviadas al laboratorio por las malas condiciones de conservación en que permanecieron hasta que fueron halladas o por la antigüedad que tienen.

En este caso el ADN mitocondrial se encontrará en mejor estado que el nuclear debido a su mayor número de copias por célula y de no obtener resultados concluyentes en el análisis del ADN nuclear de este tipo de muestras, se pueden obtener resultados positivos en el análisis de su ADN mitocondrial. Tal es el caso de restos óseos y dientes antiguos o sometidos a condiciones extremas.

2. Cuando la cantidad de muestra de que se dispone es mínima (pelos sin bulbo por ejemplo). Un pelo con bulbo caduco o un fragmento de pelo contendrá una cantidad de ADN nuclear tan escasa que en principio los análisis de estas muestras mediante ADN nuclear resultará negativo. Por ello, de rutina este tipo de muestras se procesan directamente mediante el análisis de ADN mitocondrial.

3. En la identificación de restos biológicos y el establecimiento de una relación familiar cuando no se dispone de los progenitores y no queda más remedio que realizar una comparación con familiares más lejanos. Si se trata de familiares vía materna tendrán exactamente el mismo ADN mitocondrial aunque se trate de familiares lejanos

4. Cuando existe un sospechoso en un hecho delictivo pero no se dispone de muestra indubitada del mismo, se puede recurrir al estudio del ADN mitocondrial de un familiar relacionado matrilinealmente para excluirlo.

b) ADN nuclear (genómico); ADN repetido en tandem o VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), que puede ser:

- Minisatélite o MVR (Minisatellite Variant Repeats): secuencia de unas 30 pb (pares de bases).
- Microsatélite o STR (short tandem repeats): secuencia de 2 a 6 pb, normalmente 4. Por ejemplo, la secuencia ACTTACTTACTT ... ACTT puede aparecer repetida 8 veces en un locus y 12 veces en otro locus. Así, un individuo puede ser homocigoto 8-8, heterocigoto 8-12 u homocigoto 12-12.

c) Cromosoma Y: Se analizan microsatélites (STRs) y el polimorfismo de nucleótidos simples (SNPs). Existen varios casos especiales en los cuales el análisis de los polimorfismos situados en el cromosoma sexual Y pueden ser de gran utilidad:

- c.1 Casos de paternidad
- c.2 Casos de mezclas
- c.3 Como herramienta de «screening» o ayuda

c.1 Casos de paternidad:

c.1.1 Casos de paternidad en los que no se dispone de material biológico de la madre; bastará con disponer de la muestra del padre y compararla con la del presunto hijo para comprobar si ambas presentan idénticos polimorfismos Y.

c.1.2 Casos de paternidad en los que no existe presunto padre: Otros parientes del hijo putativo como los hijos de tíos paternos pueden ser analizados mediante marcadores del cromosoma Y. Si los cromosomas «Ys» de esos familiares no son idénticos al del hijo en cuestión, estaremos ante una exclusión, aunque también es posible que la «no-paternidad» ocurriera en la generación previa (es decir, que el padre ausente no fuera en realidad hermano por parte de padre de los tíos paternos del hijo putativo).

c.2 Casos de mezclas:

c.2.1 Agresiones sexuales en las que el semen del sospechoso varón se encuentra mezclado con células de una víctima mujer: Los polimorfismos del cromosoma Y permiten una detección más sensible de la presencia de ADN de un individuo masculino aún cuando éste se encuentre inmerso en una gran cantidad de ADN femenino. Con marcadores autosómicos esto no ocurre pues se produce la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), referentemente sobre el material femenino si la cantidad de células epiteliales femeninas es muy superior al número de espermatozoides. Además, el uso de polimorfismos de ADN del cromosoma Y nos permite incluir o excluir a un sospechoso.

c.2.2 Delitos sexuales en los que el agresor es un individuo azoospérmico: Los individuos azoospérmicos tienen ausencia de espermatozoides en el eyaculado debido a defectos congénitos, o a la práctica de vasectomía o bien debido a factores ambientales. Los espermatozoides son la mayor fuente de ADN en las muestras de semen, por lo que un individuo azoospérmico tiene mucho menos ADN seminal para el análisis. La cantidad de ADN por mL en el eyaculado de un individuo espérmico es aproximadamente de 450 µg en los espermatozoides y de 30 µg en los leucocitos y células epiteliales. Por ello, en un individuo azoospérmico, el contenido de ADN es aproximadamente de sólo el 6.3% del contenido en un individuo espérmico. Por las mismas razones que en el caso anterior, es posible la detección de ADN de las células epiteliales y los leucocitos en eyaculados de individuos vasectomizados aunque se encuentre mezclado con ADN de la víctima.

c.2.3 Agresiones sexuales múltiples: el uso de los microsatélites del cromosoma Y en estos casos permite determinar el número mínimo de agresores.

c.2.4 Otros tipos de mezclas: En mezclas de sangre-sangre, o de sangre-saliva, o de sangre-pelos, el cromosoma Y es una herramienta de trabajo que puede aportarnos valiosa información.

c.3 Como herramienta de «screening» o ayuda:

c.3.1 En casos de agresión sexual: los polimorfismos Y pueden servirnos para relacionar rápidamente estos casos (bases de datos) y excluir sospechosos de manera rápida antes de profundizar en marcadores autosómicos.

c.3.2 En grandes catástrofes: Cuando en una catástrofe aparece un gran número de cadáveres puede ser interesante clasificarlos según sus polimorfismos Y para poder discriminar qué cadáveres tendremos que cotejar con cada familia antes de realizar los estudios de ADN nuclear autosómico. Esto resulta muy útil cuando, por ejemplo, los familiares vivos que se usan como muestras de referencia son los hermanos de las víctimas.

Para terminar este apartado diremos que tanto el ADNmt como los polimorfismos del cromosoma Y tienen mucho menos poder de discriminación que el ADN nuclear autosómico utilizado habitualmente. Ninguno de estos tipos de ADN identifica individuos, sino líneas familiares maternas y paternas, por tanto, la coincidencia de estos polimorfismos entre muestras dubitadas e indubitadas debe valorarse con menor fuerza.

C. ANÁLISIS DE ADN MINISATÉLITE MEDIANTE SONDAS

Se identifican como polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs).

a) Sondas multilocus

La historia de las aplicaciones forenses de los polimorfismos de ADN se inició en 1984 cuando Weller y colaboradores descubrieron en un intrón del gen humano de la mioglobina la existencia de una región hipervariable constituida por cuatro repeticiones en tandem de una secuencia de 33 pares de bases (minisatélite). Al año siguiente, Jeffreys y colaboradores (1985 a) encontraron que dicha región hipervariable aparecía con ligeras modificaciones en otros genes, diseñando sondas de ADN (sondas multilocus) que permitían identificar simultáneamente muchas de dichas regiones hipervariables.

Este hecho les llevó a pensar que dichos patrones de minisatélites multilocus detectables por la sonda serían característicos de cada individuo, constituyendo algo así como su “huella dactilar de ADN” (DNA fingerprint) (Jeffreys y col., 1985 b). Sin embargo, debido a la dificultad de estandarización de la técnica y de la creación de bases de datos, así como a los problemas de interpretación bioestadística de los resultados, esta metodología tuvo una escasa utilización.

b) Sondas de locus único (SLPs, Single Locus Probes)

La técnica permite detectar loci minisatélites únicos bajo condiciones de hibridación molecular muy restrictivas. Se utiliza principalmente en investigaciones de paternidad porque identifica loci minisatélites muy informativos.

Para validar estas técnicas fue necesario estandarizar las enzimas de restricción utilizadas para fragmentar el ADN (en Europa se eligió en principio la enzima *Hinf I*), así como las sondas que reconocen los loci minisatélites muy variables (con más del 90% de heterocigosis). Los individuos se caracterizan por el tamaño de los RFLPs y no por el número de repeticiones.

D. ANÁLISIS DE VNTRS MEDIANTE EL ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

El método de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP («*Restriction Fragment Length Polymorphism*») se basa en la utilización de unas enzimas denominadas *enzimas de restricción o restrictasas* que funcionan a modo de «tijeras moleculares» y cortan el ADN de forma específica en determinadas secuencias que han reconocido previamente. Las posibles diferencias en la secuencia del ADN entre dos individuos hacen que, para cada marcador, el tamaño de los fragmentos de ADN generados pueda ser distinto.

Los fragmentos de ADN resultantes pueden separarse en función de su tamaño mediante una *electroforesis* en gel, que consiste en la aplicación de un campo eléctrico a una matriz gelificada sobre la que se han cargado las muestras objeto de estudio, tras su reacción de restricción, siendo esta reacción enzimática. Como consecuencia de la diferencia de potencial entre ambos extremos del gel, los fragmentos de ADN (que tienen carga negativa) migran hacia el polo positivo y lo hacen a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, de forma que los fragmentos más pequeños alcanzan posiciones más adelantadas en el gel que los fragmentos más grandes.

A continuación, se transfieren los fragmentos de ADN desde el gel a una membrana (método «*Southern blot*») y se fijan a ésta, y se hace una detección específica para cada marcador mediante hibridación con un pequeño fragmento de ADN marcado (*sonda unilocus*), lo que revelará la posición de una banda correspondiente a un alelo determinado (si el individuo es homocigoto) o de dos bandas correspondientes a dos alelos distintos (si el individuo es heterocigoto). La posición dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN y el conjunto de todos los marcadores analizados permitirá establecer el perfil genético de un individuo.

Inicialmente, la hibridación para la detección de las bandas se hacía con sondas *multilocus* (*Tipificación de Secuencia Multilocus; escribiendo la secuencia multilocus (MLST) técnica de biología molecular para la tipificación de múltiples loci.*) en condiciones poco estrictas, lo que permitía la detección simultánea de varios loci que daba lugar a un patrón complejo de bandas, específico para cada individuo y al que tradicionalmente se ha denominado *huella genética*. Este fue el método usado por Jeffreys en el caso de inmigración del joven de Ghana al que hacíamos referencia al principio. No obstante, dados los problemas de interpretación estadística de los resultados, de realización de estudios poblacionales y la dificultad para la estandarización de la técnica, posteriormente se desarrollaron sistemas que generan patrones más sencillos mediante hibridación con varias sondas *unilocus* y cuyos resultados son más fáciles de interpretar, manteniendo un alto poder de discriminación.

Este método se utiliza para el análisis de marcadores VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tandem), pero presenta una serie de limitaciones que no lo hacen apropiado para el análisis de un buen número de vestigios biológicos. Aparte de la complejidad y laboriosidad de la técnica, el principal inconveniente reside en que requiere entre 100 y 200 ng de ADN y además que éste no se encuentre degradado, ya que los fragmentos a analizar son de un tamaño relativamente grande.

E. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE ADN MEDIANTE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Es una técnica muy usada en criminalística porque se puede realizar a partir de cantidades muy pequeñas de ADN de la muestra (restos de sangre, semen, etc.) o por la propia degradación del ADN (restos cadavéricos).

Aunque se han utilizado polimorfismos del locus HLA o minisatélites, sin embargo el método PCR se aplica especialmente utilizando microsatélites (STRs). Por ejemplo, utilizando simultáneamente cuatro microsatélites de cuatro bases se consigue un poder de discriminación superior al 99,9 %.

a) Otras aplicaciones forenses de la PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza también en la determinación del sexo a partir de muestras de ADN, amplificando loci específicos de los cromosomas sexuales X o Y (por ejemplo, el gen de la amelogenina).

El análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) es especialmente útil en aquellos casos en los que solamente se dispone de restos óseos muy antiguos y deteriorados. Como el ADNmt se transmite sólo por vía materna, puede ser utilizado en investigar la reconstrucción de linajes.

Por ejemplo, tal es el caso del estudio de niños de padres desaparecidos al comparar el ADNmt de los niños con los de sus presuntos abuelos, tal como ocurrió en muchos casos ocurridos durante la dictadura militar argentina (Orrego y col., 1990). Fue especialmente notable la identificación llevada a cabo en 1994 de los restos óseos de la familia del último zar de Rusia (Nicolás II, su mujer Alexandra y tres hijos) encontrados en una cueva a 35 Km de Ekaterinburgo y que habían sido asesinados el 16 de Julio de 1918 (Gill y col., 1994). Incluso se manejó como muestra comparativa la del ADNmt del actual Duque de Edimburgo (esposo de la reina Isabel de Inglaterra) emparentado con la familia imperial rusa por vía materna (bisnieto de la madre de la zarina Alejandra). Su ADNmt era idéntico al de los supuestos restos de la zarina y sus tres hijos.

El análisis genético realizado por Gill y colaboradores utilizó 5 repeticiones cortas en tandem (STR), 2 regiones hipervariables del ADNmt y la determinación del sexo de los huesos utilizando el análisis del gen de la amelogenina. Los resultados científicos fueron congruentes con los datos históricos de que la familia imperial (el zar Nicolás II, la zarina Alexandra y tres hijos) fue asesinada junto con tres sirvientes y el médico de la familia.

F. STRS AUTOSÓMICOS DE USO GENERALIZADO EN GENÉTICA FORENSE

Con fines de identificación humana es importante disponer de marcadores de ADN que exhiban una alta variación entre individuos y que en conjunto permitan discriminar entre ellos.

Los STRs o microsatélites presentan la ventaja de su pequeño tamaño frente a los VNTRs o minisatélites, lo cual facilita el análisis de muestras degradadas. Además, debido a que la diferencia de tamaño entre los alelos es menor, se reduce la posibilidad de amplificación preferencial de los alelos de menor tamaño, propia de los VNTRs. Al mismo tiempo, al ser menor el rango de tamaño de los alelos se facilita la posibilidad de reacciones múltiplex. Una ventaja añadida es que la resolución de fragmentos de ADN durante la electroforesis es más precisa para fragmentos de menos de 500 pares de bases.

Actualmente existen miles de STRs identificados y se calcula que en el genoma humano existe un STR cada 10,000 pares de bases. Entre los distintos tipos de STRs, los más comunes con fines forenses son aquellos cuyas repeticiones constan de cuatro nucleótidos o cinco. Estos presentan la ventaja, frente a aquellos con unidades de repetición menores (dos o tres nucleótidos), de una mejor resolución entre alelos de tamaño próximo en individuos heterocigotos, así como una reducción en la formación de bandas «*stutter*» en la PCR.

En los criterios a seguir para la selección de STRs con aplicación en identificación humana deben primar los siguientes factores:

- alto poder de discriminación
- alta heterocigosidad
- localización en distintos cromosomas para evitar el ligamiento entre marcadores
- robustez
- reproducibilidad de resultados en reacciones múltiple
- baja tasa de mutación
- longitud de alelos en el rango de 90-450 pares de bases.

Para un intercambio y comparación de resultados efectivo entre distintos laboratorios es necesaria la utilización de una batería de marcadores genéticos comunes. Actualmente, los marcadores más extendidos a nivel mundial son los 13 STRs autosómicos integrados en el sistema CODIS («*Combined DNA Index System*») establecido en 1997 por el FBI para la creación de un banco de datos nacional. La probabilidad de coincidencia al azar entre individuos no relacionados mediante el análisis de los 13 marcadores del CODIS es inferior a uno en un billón.

Las dos principales compañías implicadas en identificación humana (*Applied Biosystems* y *Promega Corporation*) comercializan hoy en día kits para la amplificación conjunta de los 13 STRs del CODIS más dos STRs adicionales, que son distintos entre ambas firmas. De esta forma, en una única reacción es posible obtener un perfil genético bastante completo de una muestra.

G. OTROS MARCADORES DE ADN CON INTERÉS FORENSE

1. Un marcador de sexo: Amelogenina

La amelogenina es un locus localizado en una región homóloga de los cromosomas sexuales. Existe una diferencia de 6 pares de bases entre el tamaño del alelo presente en el cromosoma X y el Y, que se debe a una pequeña *delección* en el cromosoma X. El resultado de la amplificación por PCR de este locus en un ADN femenino (XX) será de una única banda (de 106 pares de bases, con los cebadores más comúnmente utilizados), mientras que si el ADN es masculino (XY), el resultado serán dos bandas de distinto tamaño (106 y 112 pares de bases, comúnmente).

La mayoría de los kits comerciales actuales incluyen este marcador, que permite la designación del sexo del individuo donante de la muestra. No obstante, hay que tener en cuenta que, aunque ocurre con muy baja frecuencia, se ha detectado la existencia de delecciones en esta región del cromosoma Y, de tal forma que una muestra masculina podría asignarse erróneamente como femenina.

2. STRs del cromosoma Y

El cromosoma Y presenta una diferencia importante respecto al resto de cromosomas, su herencia es exclusivamente paterna, es decir, se transmite de padres a hijos varones sin que exista la posibilidad de recombinación. Por tanto, la información genética contenida en el mismo se hereda como *haplotipo*, o sea, los genotipos para cada uno de los marcadores del cromosoma Y se transmiten en bloque y no de forma independiente. De esta forma, salvo posibles mutaciones, todos los individuos varones emparentados por vía paterna comparten el mismo haplotipo para el cromosoma Y.

En los últimos años, el análisis de marcadores del cromosoma Y se ha extendido en los estudios de evolución humana para trazar linajes paternos. En Genética Forense, resulta de especial utilidad en los casos de agresión sexual. En estos es común encontrar evidencias donde existe una mezcla de células femeninas de la víctima y masculinas del agresor.

Aunque existen métodos de extracción basados en una lisis diferencial que permite la separación del ADN de las células epiteliales (normalmente vaginales) del ADN de los espermatozoides, esta separación no siempre es posible, especialmente si los espermatozoides están muy deteriorados o el agresor es azoospermico. En estos casos, el uso de marcadores específicos del cromosoma Y aumenta las posibilidades de detectar pequeñas cantidades de ADN masculino presentes en un fondo de abundante ADN femenino, el cual en otro tipo de análisis (STRs autosómicos, por ejemplo) enmascararía la obtención de resultados a partir del ADN masculino. Estos marcadores han demostrado también su utilidad en casos de mezclas complejas y en estudios de filiación cuando los individuos implicados son varones.

3. ADN mitocondrial

Como se comentó anteriormente, en las mitocondrias (orgánulos presentes en el citoplasma y que proporcionan la energía a la célula) se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt). Se trata de una molécula circular de 16,569 pares de bases, en la que se localizan 37 genes implicados principalmente en los procesos de fosforilación oxidativa, y que además posee una región no codificante, denominada región control o «*D-loop*».

La región control presenta una gran variación entre individuos y, por tanto, es de utilidad con fines de identificación. El ADNmt se secuenció por primera vez en 1981 y hoy en día esa secuencia original, denominada de Anderson o secuencia de referencia de Cambridge, es la que se usa comúnmente como referencia con la que comparar las nuevas secuencias obtenidas.

Una célula posee numerosas mitocondrias, las cuales a su vez contienen múltiples moléculas de ADN, por lo que en cada célula existen entre 1,000-10,000 copias de ADNmt. Este hecho, unido a que la molécula de ADNmt es circular y a su localización en el interior de las mitocondrias (factores que lo hacen más resistente a agentes externos), hacen del ADNmt un candidato ideal para su estudio en muestras antiguas, degradadas o mínimas, así como en aquellos tejidos con muy bajo o nulo contenido en ADN nuclear, como los huesos, dientes y pelos (téngase en cuenta que por cada dos copias de un marcador de ADN nuclear autosómico existen miles de copias de ADNmt).

El ADNmt es de herencia exclusivamente materna, es decir, se transmite de la madre a toda su descendencia ya que únicamente el óvulo aporta las mitocondrias al cigoto. Por tanto, de forma similar a lo que ocurre en el cromosoma Y, el ADNmt no es único para cada individuo, sino que éste comparte la misma secuencia con los individuos relacionados con él por vía materna. Por ello, el análisis de ADNmt es de utilidad en casos de filiación y en estudios de evolución para trazar linajes maternos.

Dentro de la región control del ADNmt, existen dos regiones hipervariables principales, HV1 y HV2, que comprenden en total unas 610 pares de bases y que concentran la mayor parte de la variación entre individuos. 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.

Aunque en la mayoría de los casos, todas las moléculas de ADNmt son idénticas en un mismo individuo, puede ocurrir que coexistan moléculas con alguna diferencia puntual entre ellas, fenómeno que se conoce como *heteroplasmia*. Aunque puede complicar la interpretación de los resultados, a veces, la presencia de heteroplasmia en sitios idénticos refuerza la probabilidad de coincidencia, como ocurrió en el caso de la familia Romanov.

Tanto en el análisis de marcadores del cromosoma Y como de ADNmt, la estimación de la frecuencia de un haplotipo determinado en la población general se lleva a cabo mediante conteo del número de veces que está presente ese haplotipo en una base de datos de individuos no relacionados. Existen bases de datos generales accesibles en Internet que engloban estudios poblacionales de marcadores del cromosoma Y de toda Europa o de polimorfismos del ADNmt. Esta estima se ve influenciada por el tamaño de la base de datos, de forma que a mayor tamaño, mejor será el cálculo estadístico de la probabilidad de coincidencia al azar. En cualquier caso conviene recordar que, para ambos marcadores, un individuo compartirá el mismo haplotipo con todos los individuos relacionados con él por vía paterna (en el caso del cromosoma Y) o por vía materna (en el caso del ADNmt).

4. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

A la variación entre individuos en una localización puntual del genoma se le denomina *polimorfismo de un solo nucleótido* o SNP («*Single Nucleotide Polymorphism*»). Se estima que en el genoma humano existe un SNP cada 1,000 pares de bases y en la actualidad se han descrito más de dos millones, por lo que el análisis de SNPs promete jugar un importante papel en la diferenciación entre individuos en el futuro.

Los SNPs tienen un especial interés en Genética Forense por varias razones:

- a) no presentan el fenómeno de bandas «*stutter*», por lo que permitirían discriminar más fácilmente si una muestra es de origen único o es una mezcla.
- b) presentan un mayor potencial que los STRs para el desarrollo de sistemas múltiplex.
- c) el procesado de la muestra y el análisis de los datos es susceptible de una alta automatización.
- d) los productos de PCR para el análisis de SNPs pueden ser menores de 100 pares de bases, por lo que son especialmente apropiados para el análisis de muestras degradadas.

Los SNPs son marcadores bialélicos, es decir, sólo existen dos alelos posibles para cada locus, determinado por la presencia de una base u otra en esa posición. Por tanto, para conseguir un alto poder de discriminación se requiere el análisis de un mayor número de marcadores. Se ha estimado que se necesitaría analizar unos 25-45 SNPs para alcanzar probabilidades de coincidencia al azar similares a la de la batería de los 13 STRs del CODIS.

En los últimos años y aún actualmente, se están desarrollando nuevas tecnologías para la miniaturización y automatización de este tipo de análisis basadas en ensayos con «*microchips*» de ADN que permiten el análisis simultáneo de miles de SNPs.

XIII. HUELLA GENÉTICA (FINGERPRINT)

La huella genética es un patrón característico y específico de cada individuo debido al polimorfismo en el tamaño de zonas no codificantes del ADN, en concreto de los denominados fragmentos de restricción (RFLP). Este polimorfismo o variabilidad del ADN es debida a la presencia de secuencias cortas repetidas en “tandem” que modifican el tamaño de los alelos.

El desarrollo de técnicas analíticas, basadas en la biología molecular, que estudian éstas zonas, mediante el uso de sondas que identifican locus (sitios) únicos y muy polimórficos, han permitido un alto nivel de certeza a la hora de identificar de manera única e inequívoca un individuo, con una exactitud del 99.9%.

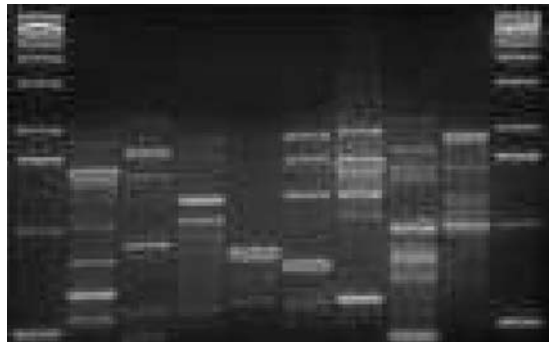


Figura 20: Huella genética o Perfil Genético.

A la dotación completa de material genético que recibimos de nuestros padres se le denomina genoma y se localiza en el núcleo de prácticamente todas nuestras células, por lo que teóricamente es posible realizar la prueba de ADN a partir de una sola célula de casi cualquier tejido.

XIV. ESTUDIOS REALIZADOS DE GENÉTICA FORENSE

Algunos estudios que podemos mencionar son:

- a) Estudios de filiación
- b) Estudios de identificación de restos cadavéricos
- c) Identificación de indicios biológicos de interés criminal
- d) Identificación de especie
- e) Estudios complementarios en casos de muerte por sumersión-asfixia

a) Estudios de filiación

El caso más simple sería la investigación biológica de la paternidad o maternidad en un trío hijo-madre-padre o bien contando únicamente con el progenitor cuestionado y el hijo. Las complicaciones aparecen cuando no es posible contar con el progenitor cuestionado por fallecimiento, siendo necesario en tal caso recurrir al análisis de otras muestras biológicas del fallecido, al análisis de familiares directos de éste que permitan reconstruir su genotipo o incluso a la exhumación del cadáver.

b) Estudios de identificación de restos cadavéricos

Se realiza mediante el análisis biológico de maternidad o paternidad o en su defecto análisis de otros familiares que compartan la línea materna o paterna. También puede recurrirse al análisis de otras muestras biológicas del fallecido o de objetos personales del mismo.

c) Identificación de indicios biológicos de interés criminal

Son el tipo de análisis más solicitado en el laboratorio de biología forense. Todos los indicios recogidos sobre la víctima, el sospechoso o el lugar de los hechos deben ser objeto de un minucioso y exhaustivo estudio que permita localizar, conocer o confirmar la naturaleza de los indicios, que varíaran en función de las características del suceso investigado. Los vestigios biológicos más frecuentes son los restos de sangre, fluidos seminales, fluidos vaginales, saliva, pelos y restos orgánicos en uñas. Otro tipo de restos biológicos menos frecuentes son la orina, las heces, la caspa y las uñas.

d) Identificación de especie

Determinados restos hallados casualmente pueden ser indicios de hechos delictivos que puedan ser causa para abrir una investigación. La solicitud de identificación de especie suele ir frecuentemente ligada al hallazgo de restos óseos muy fragmentados o cualquier otro resto orgánico del que pueda sospecharse un origen humano.

e) Estudios complementarios en casos de muerte por sumersión-asfixia

Siempre que se recupera un cadáver del agua o cuando se sospecha que la causa de la muerte puede haber sido la sumersión, será necesario confirmar los datos macroscópicos obtenidos en la necropsia mediante estudio anatómico-patológico y considerar otros datos tales como la existencia de hidremia (hemodilución de la sangre del ventrículo izquierdo respecto de la del derecho) y la existencia de elementos formados en las vísceras del cadáver que deben compararse, siempre que sea posible, con las del líquido de sumersión.

XV. METODOLOGÍA REALIZADA A LAS MUESTRAS DE INTERÉS FORENSE

Actualmente, para determinar a qué individuo pertenece una muestra biológica se recurre al estudio de parte de su ADN. La molécula de ADN se localiza dentro de las células que forman los diferentes tejidos de un individuo y para poder analizarla, previamente hay que aislarla separándola del resto de componentes celulares. A pesar de que en una primera fase aislaremos la molécula completa, posteriormente sólo estudiaremos ciertas regiones de ella, concretamente las zonas más polimórficas («marcadores», «sistemas» o «loci» polimórficos).

La analítica de ADN se realiza en cuatro fases (Figura 8):

A. Extracción de ADN

Consiste en separar la molécula de ADN del resto de componentes celulares. Se trata de un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de la molécula. Existen gran cantidad de sustancias que pueden interferir en este proceso, bien de los propios reactivos utilizados durante la extracción o bien de los soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas. La duración y rendimiento de este proceso también depende en gran medida del tipo de resto biológico que se está analizando.

Así, a partir de las muestras de sangre o de saliva el proceso de extracción es más rápido que a partir de un resto óseo o dentario donde el ADN es menos accesible.

A.1. Métodos de extracción:

a) Aquel que comprende una digestión, una extracción orgánica y una purificación-concentración o, como alternativa, una precipitación con etanol. Se utiliza para la mayoría de las muestras biológicas de interés forense.

b) Aquel que comprende una etapa de digestión seguida de una precipitación con etanol. Se usa, principalmente, para obtener mucha cantidad de ADN a partir de sangre en buen estado.

c) Aquel que comprende solo una extracción directa mediante membranas especiales o perlas de sílice o similares. Su uso se limita normalmente a muestras de sangre líquida. En el primer método de extracción, y en concreto en la digestión lo que se consigue es romper toda la estructura celular, es decir, se alteran todos los sistemas membranosos de la célula así como todas las estructuras en las que estén implicadas proteínas (nucleosomas, citoesqueleto celular, etc.), dejando el ADN libre.

Para ello, se utiliza un tampón de lisis con detergente (SDS- Dodecil Sulfato de Sodio) para solubilizar los lípidos y una enzima proteolítica (Proteinasa K) para lisar las proteínas. Una vez que se encuentran todos los componentes celulares libres entre sí, se continúa con el proceso de extracción propiamente dicho, donde se recuperará el ADN de todo ese “caldo molecular”.

El método más usado de todos es el de extracción orgánica con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (FCI) (25:24:1).

Al mezclar esta solución de FCI con el lisado celular obtenido de la etapa de digestión se genera una emulsión, que después de un centrifugado, permitirá separar el ADN de todo el material celular, aunque a veces junto con el ADN se separen otras moléculas que son una fuente potencial de inhibidores para el proceso de amplificación. Seguidamente, se añade N-butanol para eliminar los posibles restos de fenol que pudieran haber quedado en la solución acuosa. A continuación, esta solución acuosa se pasa por unidades de microfiltración-purificación para obtener un ADN lo más “limpio” posible, óptimo para el proceso de amplificación. Alternativamente a esta última etapa se puede llevar a cabo una precipitación con etanol.

El método de CHELEX, se fundamenta en la extracción de ADN mediante una suspensión de una resina quelante que es adicionada directamente a la muestra; ésta resina está compuesta por copolímeros de divinilbencen estireno, los cuales tienen en los extremos iones iminodiacetato que actúan como grupos quelantes en las uniones de iones de metales polivalentes como el magnesio.

El papel FTA™ fue desarrollado por Lee Burgoyne de la Universidad Flinders en Australia como un método de extracción y conservación de muestras (Burgoyne *et al.* 1994).

El papel FTA™ es un papel absorbente de celulosa que contiene cuatro sustancias químicas que protegen a la molécula del ADN de la degradación con nucleasas y la preservación del papel del crecimiento bacteriano (Burgoyne *et al.* 1996). Como resultado, el ADN sobre el papel FTA™ es estable a temperatura ambiente en un periodo de muchos años. Las células son lisadas al contacto con el papel y el ADN de las células sanguíneas es inmovilizado dentro de la matriz del papel; el ADN puede ser purificado por una solución de lavado, la cual remueve el grupo hemo y otros inhibidores de la reacción de PCR.

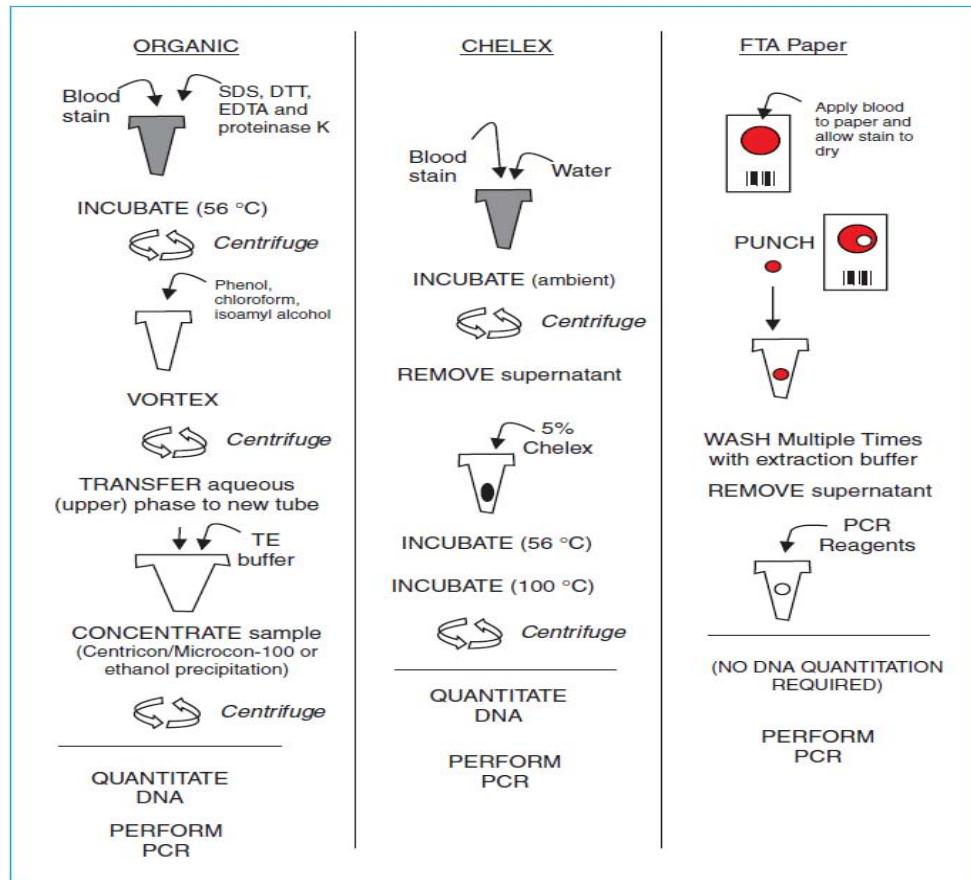


Figura 21: Métodos de extracción de ADN más frecuentes

Otro tipo de extracción es la diferencial, la cual es una versión modificada del método de la extracción orgánica, que separa células epiteliales de células espermáticas. La extracción diferencial fue descrita por primera vez en 1985 (Gill *et al.* 1985) y es comúnmente usada aun por los Laboratorios del FBI y otros laboratorios del crimen forense para la diferenciación de fracciones masculinas y femeninas en casos de crímenes sexuales que contienen una mezcla de ADN masculino y femenino.

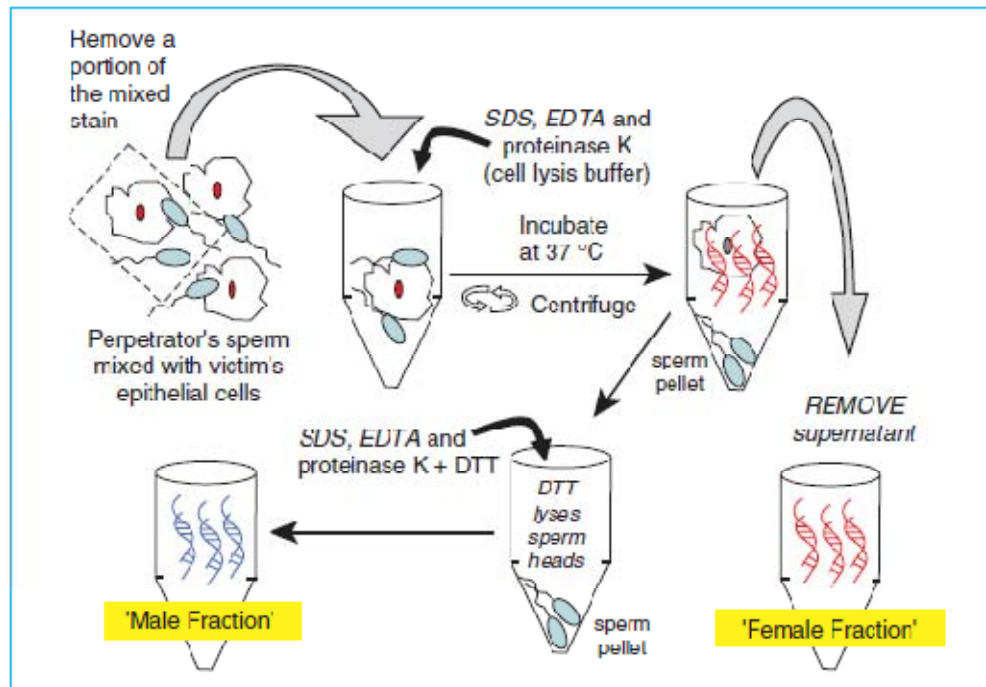


Figura 22: Extracción Diferencial.

El procedimiento involucra preferencialmente el rompimiento de las células epiteliales femeninas con incubación en una mezcla de ADS/proteinasa K; el núcleo de la célula espermática es subsecuentemente lisado por un tratamiento con una mezcla de SDS/proteinasa K/ditiotreitól (DTT).

B. Purificación de ADN

El tratamiento de muestras forenses como pequeñas manchas de sangre, saliva o espermatozoides, resulta algo más complicado en cuanto a la extracción de ADN porque, en última instancia, se obtienen cantidades de dicha molécula muy reducidas. Uno de los principales problemas que nos encontramos en las muestras forenses críticas es la presencia de sustancias distintas a los ácidos nucleicos que se co-extraen durante el procesamiento de las muestras. A menudo es difícil separar la muestra de su soporte sin que algunos componentes de éste último pasen al extracto. Estas sustancias pueden interferir en los análisis posteriores por ejemplo inhibiendo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Por ello es conveniente realizar una purificación de los extractos de ADN una vez obtenidos.

Con los filtros especiales del tipo Centricon y Microcon (Amicon, USA) se logra esta purificación obteniéndose una dilución final más pura. Además se logra concentrar el ADN extraído, hecho muy interesante en muestras tan críticas como las nuestras. Estos filtros poseen una membrana hidrofílica con muy baja capacidad de adsorción, lo cual permite el paso a través de ella de gran parte del solvente de nuestro extracto y de todos los solutos de bajo peso molecular, reteniendo los solutos más pesados (ADN). Con ello se consigue concentrar la solución de ADN hasta 80 veces, con una pérdida mínima de éste.

B. 1 Recomendaciones

Como en otros tipos de análisis, las muestras deben ser manipuladas cuidadosamente para evitar la contaminación entre ellas o con ADN extraño a ellas. En el laboratorio forense deben de realizarse rutinariamente las siguientes recomendaciones durante el proceso de extracción:

- Procesar las muestras dubitadas (evidencias) separadas en el tiempo de las muestras de referencia o indubitadas para evitar contaminaciones entre ambos tipos de muestras.
- Procesar un tubo con todos los reactivos usados durante la extracción menos el ADN a modo de control negativo para detectar las posibles contaminaciones de los reactivos de extracción.
- No procesar un número elevado de muestras a la vez para evitar equivocaciones durante el proceso.
- Meter en autoclave y llevar a la alícuota los reactivos para evitar que sean abiertos demasiadas veces ya que pierden su condición de estériles.

C. Cuantificación de ADN

La determinación adecuada de la concentración de ADN en una muestra es muy importante al desarrollar muchos procedimientos en el campo de la Genética Molecular. Centrándonos en el proceso de amplificación del ADN, tanto el exceso como el defecto de la cantidad de ADN en la mezcla de reacción pueden influir hasta el punto de no obtener ningún resultado en el análisis. Por ello, es una cuestión primordial el conocimiento de la cantidad de ADN obtenida durante la extracción con el fin de realizar la dilución apropiada para asegurar el éxito de la amplificación. Además del conocimiento de la cantidad de ADN es también muy importante saber el estado en el cual se encuentra (degradado o no) y si todo el ADN extraído es de origen humano o no, pues ambos parámetros influyen en las reacciones de PCR como veremos más adelante.

C. 1 Fluorometría

La medida de la cantidad de ADN mediante fluorometría se basa en la capacidad de unión del ADN a ciertos tintes fluorescentes como H 33258 (bisbenzimidazol). A mayor cantidad de ADN, mayor número de moléculas del tinte unidas, detectaremos mayor fluorescencia. La fluorescencia de dicho tinte depende de la cantidad de pares A-T presentes en la molécula de ADN, por lo que es un método que detecta fundamentalmente ADN de doble hebra (Brunk y cols., 1979; Labarca y Paigen, 1980).

La determinación de la cantidad exacta de ADN se realiza mediante la comparación de la muestra problema con muestras de cantidad de ADN conocida (patrones). Es imprescindible que los patrones estén formado por ADN de las mismas características que la muestra a medir, es decir, deben de tener la misma proporción de pares A-T (la mayoría del ADN de animales y plantas presenta un 60% de pares A-T y un 40% de pares G-C) y la misma conformación. Para medir la fluorescencia se utilizan aparatos específicos llamados fluorómetros que constan de una lámpara de mercurio y un detector para medir fluorescencia relativa a 460 nm.

Este método presenta la ventaja de que la presencia de ARN en la muestra no interfiere en el resultado de la cuantificación de ADN, ya que el ARN no compite con el ADN en la unión con el tinte. Pero presenta la desventaja de que mide cantidad de ADN sin discriminar si se trata de ADN humano o no humano y sin darnos información alguna sobre el estado de conservación del mismo. Además no es compatible con la extracción de ADN con resinas quelantes, ya que no permite la cuantificación de ADN de hebra sencilla.

C. 2 Espectrofotometría

Este método se basa en la medida de la cantidad de luz ultravioleta que absorben las purinas y pirimidinas sustituidas que son las unidades que absorben radiación ultravioleta en los ácidos nucleicos y sus derivados, ya que los azúcares y los residuos de fosfatos son transparentes a longitudes mayores de 200 nm. Las bases nitrogenadas contienen dobles ligaduras en su estructura; así como grupos cetona y amino, las cuales absorben a diferentes longitudes de onda. Por ello, está sujeto a interferencias debidas a materiales que habitualmente están presentes en las muestras biológicas. Niveles significantes de ARN, nucleótidos sueltos o proteínas en solución son algunas de estas sustancias que contribuyen a la absorbancia a 260 nm, resultando así una sobre-estimación de la concentración de ADN en la lectura.

En esta cuantificación se utiliza un espectrofotómetro y se han de realizar lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra de tal manera que resultados de 1 OD (unidad de densidad óptica) corresponderían aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de doble hebra, 40 µg/mL de ADN de hebra simple y ARN, y aproximadamente 20 µg/mL de oligonucleótidos de hebra sencilla. El radio entre las lecturas a 260 y 280 nm (OD_{260} / OD_{280}) dan una estimación de la pureza del ácido nucleicos.

Las preparaciones puras de ADN y ARN tienen valores de 1.8 y 2 respectivamente para este radio. Si existe contaminación con proteínas o fenol, el radio OD_{260} / OD_{280} dará valores significativamente más bajos que los anteriores y no se podrá realizar una cuantificación adecuada de la muestra (Sambrook y cols., 1989). Además el método tiene la desventaja de ser muy poco sensible pues no detecta concentraciones de ADN inferiores a los 250 ng/mL por lo que no suele ser un protocolo elegido en el análisis forense.

C. 3 Minigel de Agarosa

Cuando las muestras pueden estar contaminadas con otras sustancias que absorben la radiación ultravioleta impidiendo una cuantificación con el método anterior, se puede estimar la cantidad de ADN midiendo la fluorescencia inducida por ultravioleta que se produce cuando se intercalan moléculas de Bromuro de Etidio entre el ADN. Como la cantidad de fluorescencia es proporcional a la masa total de ADN, la cantidad de ADN en la muestra puede estimarse comparándola con la fluorescencia emitida por patrones estándar de cantidad de ADN conocida.

El método se suele llevar a cabo sometiendo a las muestras de ADN extraído a un campo eléctrico para que las moléculas se muevan, a través de una matriz de agarosa que contiene bromuro de etidio, en función de su tamaño. A la vez que las muestras problema, se procesan muestras de ADN de cantidad conocida (patrones) y por simple comparación de unas con las otras podremos estimar a groso modo la cantidad de ADN de cada muestra problema. Se trata de un sistema de cuantificación poco sensible pues es realmente difícil observar en el minigel cantidades de ADN menores que 5 ng totales. Pero tiene la gran ventaja de que con este método se puede visualizar el grado de degradación de nuestras muestras problema; si el ADN está en buen estado aparecerá en el gel como una banda nítida que no ha recorrido mucha distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto peso molecular, es decir, de gran tamaño.

Si, por el contrario, nuestro ADN está fragmentado, aparecerá en el gel una especie de “cola de degradación” (*smear*) a lo largo de la calle en la cual hemos aplicado la muestra debido a que existen fragmentos de diferentes tamaños que recorren diferentes distancias desde el punto de aplicación (Figura 23). En este tipo de muestras degradadas, la cuantificación se hace aún más difícil por no poder realizarse una comparación adecuada con los patrones que son de alto peso molecular y aparecen como bandas nítidas.

Otro problema del método es que no es específico de ADN humano, es decir, detecta cualquier ADN independientemente de su procedencia. Si el ADN extraído es de origen animal, por ejemplo de un perro, lo visualizaremos igual que una muestra de origen humano, si bien existen otros métodos que se pueden realizar antes de la extracción de ADN para saber el origen las muestras problema (por ejemplo, el test de Ouchterlony).

En ocasiones, las muestras forenses, aunque sean de origen humano, vienen acompañadas de hongos, moho o bacterias si ya han comenzado los procesos de putrefacción. El ADN de las bacterias es de menor tamaño que el ADN humano, por lo que en teoría serían distinguibles ambos ADNs con una electroforesis en agarosa. Sin embargo, en la práctica esto no es así, ya que normalmente el ADN humano de estas muestras contaminadas está degradado y por tanto pueden existir fragmentos de igual tamaño que el ADN contaminante bacteriano, lo cual hace que sean indistinguibles.

La electroforesis submarina suele utilizarse en combinación con otros métodos de cuantificación como la hibridación con sondas por dos motivos fundamentalmente: porque la hibridación es un método más exacto en cuanto a la determinación de cantidad de ADN y además cuantifica ADN humano únicamente (de primates superiores en realidad); por otro lado las muestras que tienen gran cantidad de ADN no pueden cuantificarse directamente con la hibridación con sondas ya que normalmente por encima de los 10 ng.



Figura 23: Minigel de Agarosa para cuantificación de ADN.

Este método no tiene sensibilidad, porque se tienen concentraciones altas y no se distinguen con facilidad, por ello es necesario realizar una dilución antes de cuantificar por medio de la hibridación. Para saber qué dilución se debe realizar de forma aproximada es imprescindible cuantificar primero con otro método, como la electroforesis submarina en geles de agarosa. Usando la combinación de ambos métodos se puede saber la cantidad de ADN humano de las muestras y el estado de degradación en el cual se encuentran.

D. Amplificación de ADN

Consiste en copiar muchas veces el fragmento concreto de ADN que se quiere estudiar para obtener una cantidad adecuada que nos permita su detección. Este proceso se denomina PCR (polymerase chain reaction) y gracias a él 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 (multiplex PCR).

a) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la mayoría de los casos, la estrategia a seguir en el estudio de ADN procedente de restos forenses consiste en extraer el material genético y posteriormente someterlo a una amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN de cualquier origen (procedente de virus, bacterias, plantas, animales o humanos) y se basa en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN conocida (Mullis y cols., 1986; Mullis y Faloona, 1987). Se trata de una reacción especialmente valiosa por su alta especificidad, su fácil automatización, y por su capacidad de amplificar (copiar) pequeñísimas cantidades de muestra. Por todo esto ha tenido un gran impacto en campos como la medicina clínica, el diagnóstico de enfermedades genéticas, la biología evolutiva y por supuesto, la biología forense.

Además, esta técnica ha permitido introducir el estudio de los marcadores de ADN, los cuales presentan un contenido polimórfico sin precedentes en relación con los polimorfismos de marcadores proteicos que se solían utilizar en los estudios de identificación. Se pueden estudiar un gran número de marcadores hipervariables incluso en una única reacción.

Las bases teóricas de la PCR no son complicadas. El fragmento de ADN a amplificar está delimitado por dos fragmentos cortos de ADN o cebadores ("primers") que se sintetizan químicamente. Estos cebadores son complementarios con las secuencias de bases que flanquean el fragmento a estudiar. Los cebadores inician en el tubo de ensayo una amplificación que se continúa en ciclos sucesivos. En cada ciclo se duplica el número de copias de la secuencia deseada, respecto al ciclo anterior.

Cada ciclo comienza con la separación de las dos cadenas de ADN molde. Posteriormente los dos cebadores se sitúan en sus respectivas secuencias diana complementarias, una de cada cadena. Una enzima, la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que no se altera a elevadas temperaturas, agrega entonces bases en los extremos de los cebadores, alargando las dobles hélices que el cebador había iniciado (Saiki y cols., 1985). Como cada cadena produce una nueva hélice doble, se duplica en cada ciclo la secuencia de ADN deseada.

El primer ciclo de síntesis produce nuevas cadenas hijas de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los "*primers*". En el segundo ciclo de síntesis, estas cadenas hijas sirven como nuevos moldes y, en este caso, los fragmentos resultantes ya no tendrán una longitud indefinida, sino que su tamaño estará delimitado por los "*primers*" de la reacción. Las nuevas cadenas hijas formadas servirán de molde para sucesivos ciclos de síntesis.

La evolución de la técnica ha permitido hacer la reacción cada vez más sencilla y eficaz. Los primeros procedimientos de PCR se realizaban manualmente con calor húmedo en baños con la temperatura prefijada; hoy en día se realiza de forma automática en un termociclador. Se trata de un aparato compacto que consta de un bloque térmico cuya temperatura va variando según el plan de datos introducido por el usuario y en cuyo interior se depositan las muestras. El aparato está provisto de un termostato que produce oscilaciones constantes y cíclicas de la temperatura rápidamente. Esta automatización ha permitido mejorar mucho el rendimiento y la reproducibilidad de los experimentos. Cada ciclo transcurre con los siguientes cambios (Figura 24 y 25).

1° Fase de desnaturalización (90°C-95°C): se produce la separación (desnaturalización) de las hebras de nuestro ADN molde también llamado "*template*". La temperatura a la cual se alcanza dicha desnaturalización depende de la composición de bases de la doble hélice, son necesarias temperaturas más elevadas si existe un mayor número de pares de bases del tipo G-C contenidas en la molécula (Ruano y cols., 1992). Esto se debe al hecho de que la Guanina y la Citosina se unen mediante tres puentes de hidrógeno mientras que la Adenina y la Timina lo hacen mediante dos por lo que resulta lógico pensar que será más difícil separar pares G-C que pares A-T y por ello serán necesarias mayores temperaturas en el primer caso.

2° Fase de apareamiento o hibridación ("*annealing*") (40 a 60°C): se colocan los cebadores o "primers" en las zonas complementarias de la hebra molde. Sin este apareamiento inicial de los cebadores no puede comenzar a trabajar la polimerasa. La temperatura a la que transcurre el "*annealing*" es específica de la secuencia y longitud del cebador y se determina experimentalmente, aunque existen algunos métodos que pueden ayudarnos a la elección de la temperatura de hibridación antes de realizar el experimento. La elección de la temperatura en este paso es un parámetro crítico pues si es demasiado alta no se producirá anillamiento y no habrá amplificación y si es demasiado baja se incrementará el anillamiento inespecífico y aparecerán productos no deseados (si el extremo 3' de un primer se anilla en cualquier lugar del molde, aunque el resto del "*primer*" no se anille específicamente, el oligo será elongado).

3° Fase de elongación o extensión (70-75°C): con los cebadores apareados, la polimerasa comienza a sintetizar la hebra complementaria mediante la adición al extremo 3'OH de desoxinucleótidos libres disponibles en la mezcla de reacción (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), de tal forma que el crecimiento de la nueva hebra se realiza en sentido 5' → 3'. El orden o secuencia de los nucleótidos de la hebra "hija" está determinada por el orden de la hebra "madre", basándose en las reglas de complementariedad (Adeninas siempre apareadas con Timinas y Citosinas con Guaninas). La temperatura más comúnmente usada es 72°C pues se encuentra cerca de la temperatura óptima de actuación de la Taq polimerasa (75°C), pero la elongación suele comenzar durante el anillamiento, ya que a 55°C la Taq es parcialmente activa.

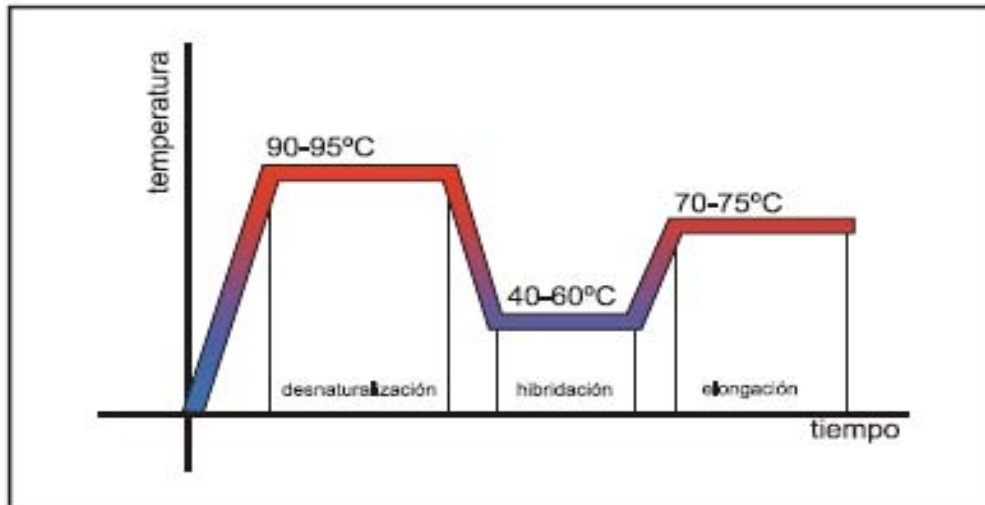


Figura 24: Gráfico que representa las variaciones de temperatura de cada alelo de PCR.

Cada una de estas fases requiere un tiempo mínimo para ser efectiva, y el cual se determina de manera empírica y es conveniente no alargarlo para evitar el riesgo de envejecimiento de la enzima. Suele oscilar entre 30 segundos y varios minutos según la fase en la cual nos encontremos.

1° Fase de desnaturalización: un tiempo de 30-60 segundos a 94°C suele ser suficiente para obtener buenos productos de PCR. Si prolongamos el tiempo de desnaturalización, aumentaremos el tiempo al cual la enzima está sometida a elevadas temperaturas y por ello se incrementará el porcentaje de moléculas de Taq convencional que pierden su actividad. De cualquier manera, el tiempo de desnaturalización debe incrementarse si el ADN molde tiene un contenido elevado de pares GC.

2° Fase de apareamiento: para la mayoría de las reacciones PCR es suficiente un tiempo de 30-60 segundos en la fase de anillamiento.

3° Fase de elongación: El tiempo de incubación para la elongación varía según la longitud del fragmento que queremos amplificar pues la actividad de la Taq polimerasa a temperatura óptima suele ser de 2,000 nucleótidos incorporados por minuto; el tiempo de extensión en la reacción, por tanto, se puede calcular de acuerdo con la actividad de la enzima (20 segundos para fragmentos de menos de 500 pares de bases, 40 segundos para unos 1,200 pares de bases, hasta varios minutos para fragmentos de varias Kilobases).

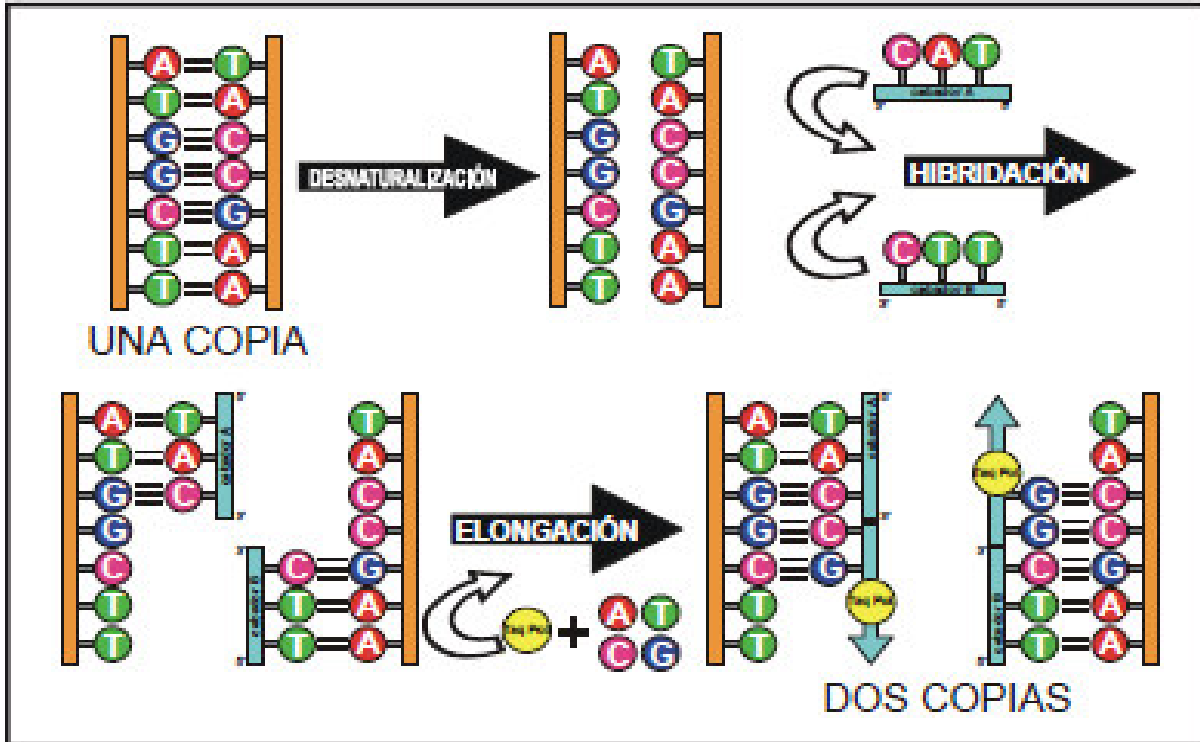


Figura 25: Desarrollo de un alelo de PCR.

Lo mismo ocurre con el número de ciclos de PCR, que se determina de manera empírica y oscila entre 20 y 35. Si se requiere obtener una mayor cantidad de producto amplificado se puede aumentar este parámetro, pero se debe considerar que dicho aumento irá en deterioramiento de la calidad, es decir, aparecerán más errores en las nuevas moléculas debido al empobrecimiento de la reacción.

El resultado es la amplificación de un producto génico un número determinado de veces. Como los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como molde en el siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo. Así pues, después de 20 ciclos, la PCR rinde 2^{20} copias (Figura 26). Para amplificaciones que "a priori" no presentan problemas se recomiendan amplificaciones de 28-30 ciclos, pero este número se puede aumentar si el rendimiento de la PCR es bajo debido por ejemplo a la escasa cantidad de ADN molde.

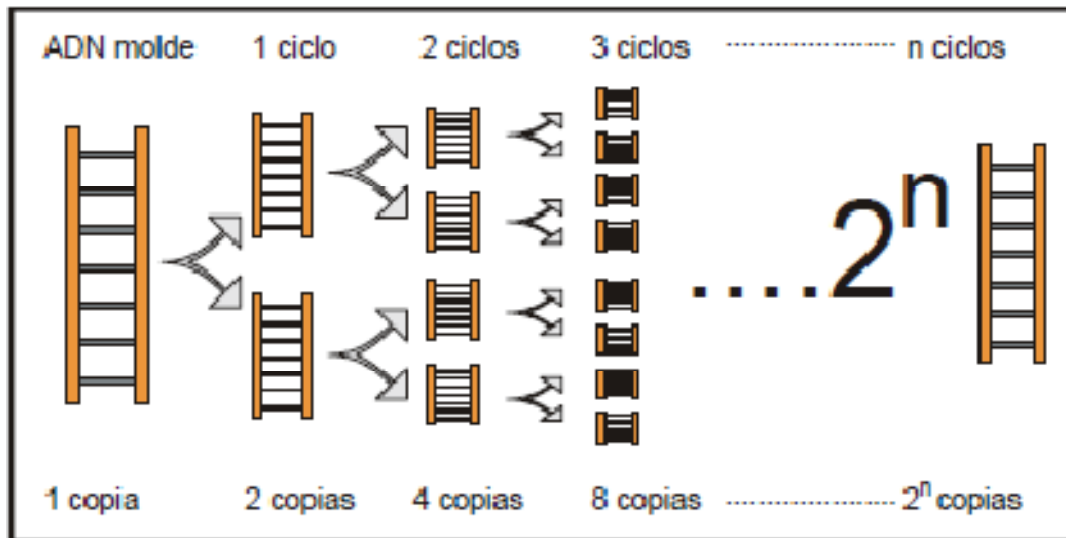


Figura 26: Desarrollo de una reacción PCR de n alelos.

Resumiendo, la técnica descrita es extraordinariamente sensible, es posible teóricamente generar miles de millones de copias a partir de una molécula de ADN. Una o muy pocas moléculas de ADN intactas que sobrevivan en un tejido pueden amplificarse por PCR.

La gran sensibilidad de la PCR puede ser un inconveniente. Cualquier fragmento de ADN exógeno a la muestra que contamine el experimento será amplificado si lleva secuencias que puedan ser reconocidas por los cebadores, con lo que se pueden obtener falsos positivos (Kwok y Higuchi, 1989). Existen varias fuentes potenciales de contaminación:

- a) Contaminación con ADN humano procedente del ambiente de trabajo.
- b) Contaminación mediante ADN de origen bacteriano o fúngico procedente incluso de la propia muestra a analizar, que si bien no se espera que anille con los cebadores por tratarse de ADN no humano, sí puede interferir en la reacción disminuyendo el rendimiento de la misma.
- c) Contaminación cruzada de unas muestras a otras durante la preparación de las mismas. Este hecho es habitual cuando se procesa un gran número de muestras a la vez por la gran atención que se requiere durante un tiempo que puede considerarse prolongado.

La fuente de contaminación más peligrosa es la que se conoce como "*carry-over*" de productos de amplificación y ocurre cuando un ADN ya amplificado contamina a una muestra que todavía no ha sido amplificada. El producto PCR contaminante sirve como molde ideal para amplificaciones posteriores por lo que se obtendrán resultados erróneos. Este tipo de contaminación puede suceder de forma directa o indirecta como con aerosoles de una punta de pipeta sin filtro por ejemplo.

b) Riesgos y limitaciones de la PCR.

La principal ventaja de la aplicación de la PCR al laboratorio forense reside en el espectacular incremento en la sensibilidad de la técnica de individualización por ADN. No obstante, ello conlleva el inconveniente de un elevado riesgo de contaminación, ya que cualquier resto de ADN exógeno presente en una muestra es susceptible de amplificación.

Por ello, desde el momento de la toma de la muestra (del individuo implicado o bien del lugar de los hechos) hasta la última etapa de la amplificación en el laboratorio, es necesario seguir estrictamente una serie de precauciones que eviten la contaminación cruzada con otras muestras o con material biológico proveniente del personal implicado en la investigación.

En un laboratorio de Genética Forense se precisa una separación máxima de las áreas de trabajo dedicadas a la toma de muestras, extracción de ADN, amplificación y detección de los productos amplificados, así como de los reactivos y material usado en cada etapa.

La manipulación de las muestras y sus extractos de ADN debe realizarse siempre con la protección adecuada (guantes, bata...). La extracción y amplificación de ADN deben llevarse a cabo en campanas de flujo laminar utilizando reactivos y material convenientemente esterilizados. A pesar de extremar las precauciones, es necesario incluir controles positivos y negativos en la amplificación, así como disponer de los perfiles genéticos de todo el personal del laboratorio para trazar una posible contaminación por parte de un operario.

En el laboratorio de ADN forense, a menudo se trata con vestigios biológicos que están lejos de ser la muestra ideal, tanto en lo que se refiere a su cantidad como a su calidad. No debemos olvidar que, aunque la PCR ha supuesto una revolución en biología forense, presenta una serie de limitaciones que a veces son muy difíciles de salvar. Estas limitaciones se refieren principalmente a las posibilidades de:

- a) degradación, propia de muestras antiguas, putrefactas, procedentes de cadáveres en descomposición o aquellas sometidas a condiciones ambientales adversas y en las que el ADN se encuentra muy fragmentado, lo cual dificulta o impide la obtención de fragmentos de ADN del tamaño esperado.
- b) inhibición de la reacción de PCR por la presencia de determinadas sustancias como tintes textiles, altas concentraciones de melanina o hemoglobina en el extracto de ADN u otras, que bloquean a la polimerasa impidiendo la amplificación.
- c) modificación del ADN, consistente en la existencia de enlaces covalentes intra o intercatenarios, depurinización o roturas que hacen al ADN no susceptible de ser amplificado y que pueden deberse al estado de conservación de la muestra (p. ej. Tejidos en formol) o a otros factores (p. ej. luz ultravioleta).

Durante la amplificación por PCR de marcadores STRs pueden originarse una serie de artefactos que pueden interferir con una clara interpretación de los resultados y cuya consideración es necesaria para garantizar un correcto genotipado. Entre los más comunes cabe citar las bandas «*stutter*», que son fragmentos con una (o varias) unidades de repetición menos que el alelo verdadero y generados por un fenómeno de «tartamudeo» de la polimerasa durante la amplificación. Por otra parte, la polimerasa usada en la PCR normalmente añade un nucleótido extra, normalmente adenosina, al extremo del producto amplificado, proceso conocido como adenilación, y que es favorecida mediante la adición de un paso de incubación a 60 °C al final del proceso cíclico de la PCR. En determinadas circunstancias puede ocurrir que esta adenilación sea parcial y coexistan fragmentos adenilados y no adenilados, que se diferencian en un nucleótido de tamaño y que se detectarán como tales, lo cual puede dificultar una correcta asignación de alelos. Esto puede tener mayor impacto en los marcadores que presentan alelos microvariantes, que son aquellos en los que una de las unidades de repetición es incompleta y en los que, por tanto, dos alelos pueden diferir en uno o dos nucleótidos de tamaño, en lugar de los cuatro habituales.

Existen otros fenómenos que pueden complicar el análisis de los resultados, como la detección de alelos no presentes en el patrón alélico, la no amplificación (o pérdida) de algún alelo (alelo nulo), se puede deber a:

- la amplificación preferencial bien por la existencia de una mutación en la zona de apareamiento del cebador
- la detección de más de dos alelos para un marcador que puede deberse a una duplicación o traslocación de la región analizada
- una mutación parcial en la zona de apareamiento del cebador.

Por otra parte, con cierta frecuencia llegan al laboratorio muestras en las que se detectan perfiles genéticos que reflejan la presencia de una mezcla de células procedentes de más de un individuo. En estos casos, la proporción en que participa cada perfil puede ser muy desigual, por lo que podría ocurrir que para algunos marcadores haya alelos que no se detecten; en el caso de las mezclas podrían asignarse como picos alélicos sin que en realidad formen parte de ningún perfil genético. Por ello, el análisis de estos resultados es más complicado y laborioso que en los casos de perfiles únicos y requiere un alto grado de formación y experiencia por parte del perito para distinguir entre los alelos verdaderos presentes en la mezcla y los posibles artefactos (picos adicionales en los productos de la PCR, como los productos stutter y nucleótidos de adición nontemplated), lo cual no siempre es posible.

D. Detección del producto amplificado o tipaje

Esta es la fase final del análisis molecular y es la que permite caracterizar y clasificar los fragmentos de ADN estudiados en cada muestra para diferenciar unas de otras.

XVI. SISTEMAS DE DETECCIÓN DE ADN

a) Principios básicos de la electroforesis

Para analizar los fragmentos de ADN obtenidos en el PCR, se utiliza una técnica llamada electroforesis, esta puede ser en geles de agarosa o de acrilamida, permite separar fragmentos de ADN de acuerdo al tamaño de cada uno. Tanto la agarosa como en acrilamida dependiendo su concentración de estas, se forman una especie de red ó poros de tamaños diferentes, por la cual obligamos seleccionar ciertos fragmentos de ADN, “atrayéndolos” a través de corriente eléctrica, hacia el polo positivo, ya que las moléculas de ADN tienen carga negativa por la presencia de grupos fosfato (PO_4^{3-}).

Los fragmentos más pequeños pasarán primero a través de la red de cada pocillo siendo este donde depositamos el fragmento amplificado de ADN, mientras que los más grandes se irán retrasando ó quedándose en los poros; de esta manera los fragmentos de tamaños similares migrarán a ritmos similares. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán, todos juntos, por lo que podremos verlos formando lo que llamamos una banda en el gel.

La agarosa no forma redes tan uniformes, pero permite separar las moléculas de ADN en un intervalo muy grande.

b) Secuenciación

Las técnicas de este grupo van destinadas a revelar el orden de la secuencia de bases de una determinada región, normalmente delimitada previamente por PCR. Puede hacerse de forma manual o automática. En Medicina Forense se aplica, fundamentalmente, para el análisis del ADN mitocondrial por sus características especiales. En todos los casos es necesario que exista polimorfismo, es decir, que el fragmento o secuencia que vamos a estudiar sea polimórfico, lo que básicamente podemos entender como variabilidad, o sea que se presente de diferentes formas, ya que de lo contrario no podremos identificar a los individuos.

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

1.- Se trata de ADN no codificante, es decir, la información obtenida tras su análisis no nos puede aportar nada sobre ninguna de las características fenotípicas del individuo. No obstante, conforme van avanzando las investigaciones sobre el Proyecto Genoma Humano se van descubriendo que parte del ADN no codificante está relacionado con alguna característica fenotípica, bien de tipo fisiológico o bien patológico (enfermedades).

2.- Al igual que en tantos otros métodos de identificación médico-forense, es necesario llevar a cabo el método automático de secuenciación; radica en primer lugar en el tipo de marcaje.

El método automático en vez de radiactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con un nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo el ADN de nueva síntesis, producto de las cuatro mezclas de reacción.

En primer lugar, deben realizarse en cuatro tubos diferentes, cuatro mezclas de reacción. Cada mezcla de reacción contiene los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, de dTTP y dGTP), ADN polimerasa I, un cebador marcado radiactivamente y un nucleótido didesoxi, por ejemplo ddATP, a una concentración baja. El nucleótido didesoxi utilizado (ddATP en este ejemplo) competirá con su homólogo (dATP) por incorporarse a la cadena de ADN que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el momento y lugar donde se incorpora.

Por este sistema, en cada mezcla de reacción se producen una serie de moléculas de ADN de nueva síntesis de diferente longitud que terminan todas en el mismo nucleótido y marcadas todas radiactivamente por el extremo 5' (todas contienen en el extremo 5' el cebador utilizado).

Los nucleótidos didesoxi son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de ADN naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de ADN.

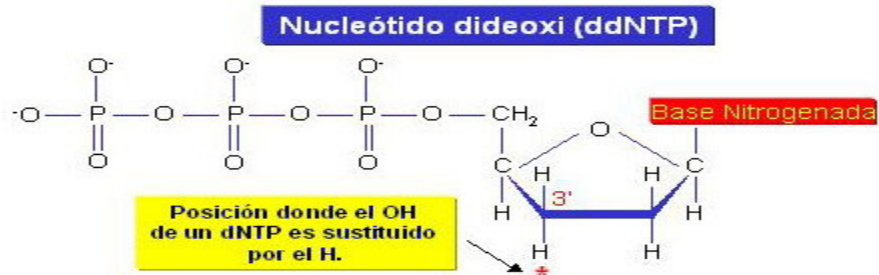


Figura 27 Ejemplo de un nucleótido dideoxi.

El sistema de detección de los fragmentos de ADN es de tipo fluorescente correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, permitiendo este sistema aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación.

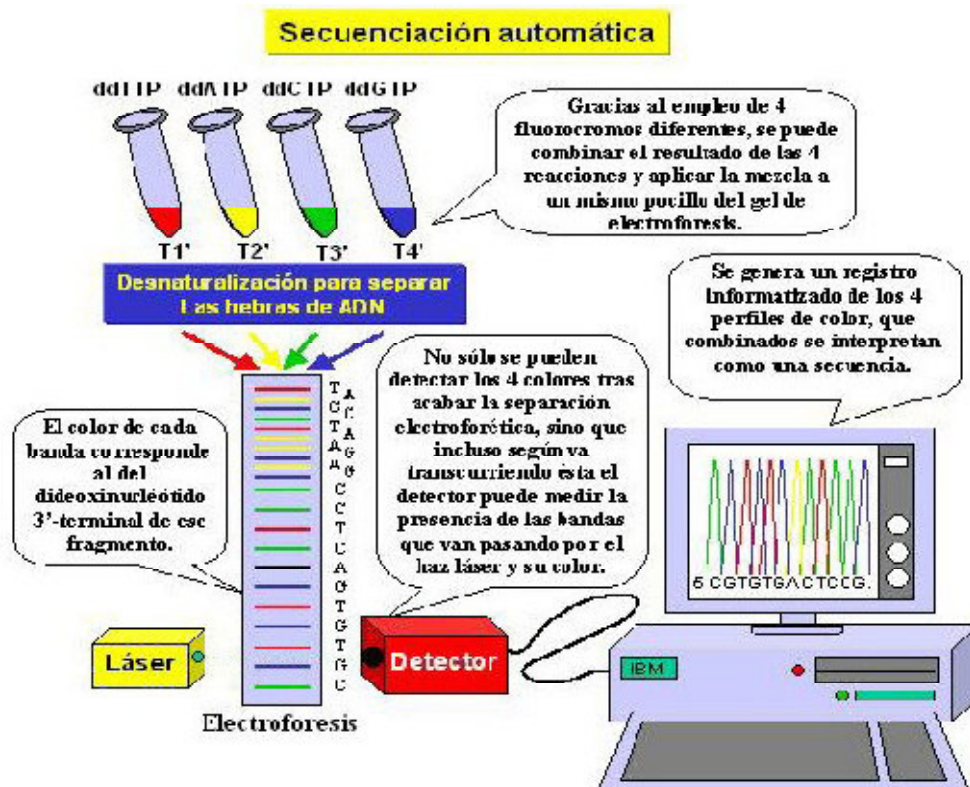


Figura 28: Esquema representando de forma abreviada el método automático de secuenciación.

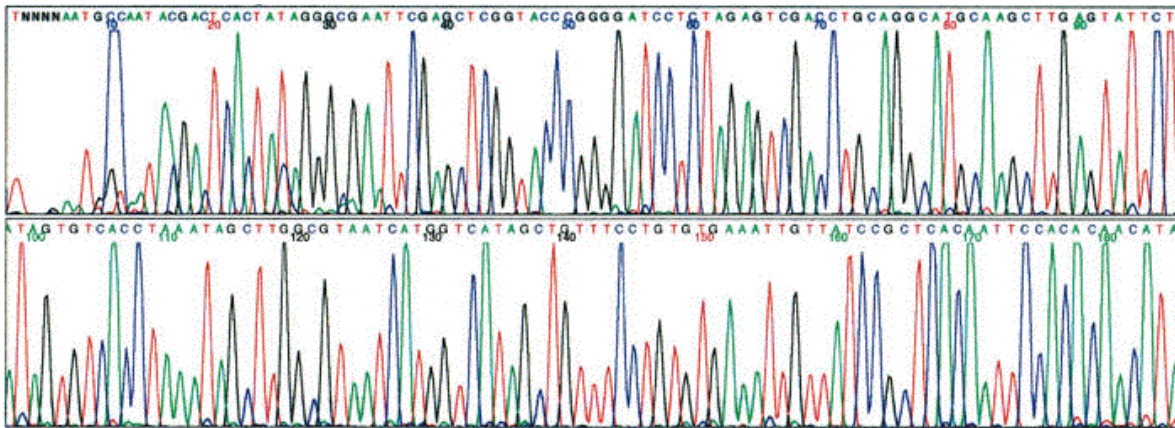


Figura 29: Ejemplo de una secuencia obtenida por el método automático de secuenciación. Cuando aparece la letra N significa que no ha sido posible determinar el nucleótido existente en esa posición de la secuencia.

XVII. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Una vez que se ha finalizado el estudio molecular propiamente dicho se procede al análisis de los resultados obtenidos. Podemos encontrarnos con dos situaciones:

1. Que dispongamos de muestras indubitadas de referencia para cotejar con las evidencias.

En este caso, el resultado de la comparación entre muestras dubitadas e indubitadas puede ser de dos tipos:

- 1.1 Coincidencia o compatibilidad
- 1.2 No coincidencia o incompatibilidad

1.1 *Coincidencia o compatibilidad:* el perfil genético evidenciado en ambos tipos de muestras es coincidente (criminalística) o compatible (paternidades). En este caso se ha de valorar estadísticamente si la coincidencia es debida al azar o a que realmente la evidencia biológica pertenece al individuo de referencia.

Es evidente que este análisis depende «a priori» del número de marcadores analizados en las muestras y una vez realizado el análisis, de lo frecuente o no que sean los alelos de cada marcador (por ejemplo, en el hipotético caso de que estudiáramos el grupo sanguíneo, el grupo 0 es muy frecuente en nuestra población por lo que este resultado se ha de valorar con menor «fuerza» que si obtenemos un grupo AB, mucho menos frecuente). Por esta razón, los laboratorios analizan de rutina en cada muestra una batería de marcadores con elevado poder de discriminación.

1.2 *No coincidencia o incompatibilidad:* el perfil genético evidenciado en las muestras dubitadas no coincide con el de la muestra indubitada; o bien, en casos de paternidad, el supuesto padre no comparte alelos con el hijo (incompatibilidad). En estos casos no es necesario realizar una valoración estadística pues la exclusión se informa con seguridad.

En los casos donde no disponemos de muestras de referencia para comparar con las evidencias podemos introducir los perfiles genéticos obtenidos en una base de datos de perfiles anónimos. Esto nos permitirá relacionar distintos delitos entre sí, facilitando así la investigación policial y judicial en hechos reincidentes como violaciones y robos. Actualmente algunos laboratorios poseen sus propias bases de datos de evidencias, pero sería deseable que se unificaran criterios así como la información contenida en cada una de ellas con el fin de intercambiar datos de forma rutinaria.

En otros países ya existe una legislación sobre la introducción de perfiles genéticos de carácter indubitado relacionados con prácticamente todos o cierto tipo de delitos (según el país); en México sería necesario que existiera un marco legal con el fin de evitar la pérdida de información que proporcionarían dichos perfiles.

2. Que no tengamos acceso a muestras de referencia para comparar.

Además de las bases de datos de perfiles genéticos anónimos obtenidos a partir de las evidencias, existen bases de datos de perfiles procedentes de cadáveres sin identificar y de familiares de desaparecidos que dieron su consentimiento para el análisis de su ADN. Con estas bases de datos los laboratorios pretenden facilitar la difícil tarea de identificar cuando no existen otros medios que el análisis genético.

XVIII. BASE DE DATOS DE ADN

Muchos de los delitos que quedan sin resolver porque en un momento determinado no hay un sospechoso, pueden ser resueltos, incluso años después de que se hayan cometido, gracias al desarrollo de las bases de datos. Éstas pretenden colaborar en la resolución de casos criminales permitiendo la comparación automatizada de perfiles de ADN procedentes de diversas fuentes: indicios no identificados de la escena del crimen, muestras de referencia de sospechosos y muestras de referencia de víctimas. Tras las comparaciones pertinentes, y con un número suficiente de muestras analizadas, se puede comprobar si una persona (imputado o procesado) ha dejado indicios biológicos en más de una escena criminal o sobre más de una víctima. Éste es uno de los medios más eficaces de controlar a los criminales en serie y a delincuentes reincidentes, algo muy típico en casos de violaciones.

Así, se puede encontrar que una serie de violaciones han sido cometidas por la misma persona, porque el ADN del esperma coincide en todos los casos, pese que aún no se haya podido detener a ningún responsable.

Las bases de datos de ADN con fines de investigación criminal son actualmente las bases de datos genéticos de mayor interés para los laboratorios forenses. Gracias a la experiencia acumulada por un gran número de países en todo el mundo (que ya han desarrollado una legislación específica) hoy sabemos que la comparación sistemática de los perfiles de ADN provenientes de distintas causas penales estructurados en una misma base de datos pueden ser una herramienta muy eficaz para reducir el índice de criminalidad de determinados delitos sin autor conocido y, especialmente, aquellos en los que existe una alta reincidencia.

De esta forma la prueba del ADN ha dejado de ser un testigo “a posteriori” de los hechos criminales para convertirse potencialmente en una herramienta preventiva de la criminalidad.

En la práctica y para su uso, las bases de datos de identificación genética permiten la comparación automatizada a gran velocidad de los llamados “perfiles de ADN”. Estos no son sino los números y letras que identifican los fragmentos de ADN, y cuya cadena exacta es única para cada persona y presenta ciertas características comunes en el caso de parientes.

Existen diferentes bases de datos y entre todas ellas la de mayor capacidad de aplicación para el área latinoamericana es el sistema CODIS (Combined DNA Index System), desarrollado en los EE.UU. por el FBI.

Además se cuenta con otras bases de datos genéticas de gran interés para la comunidad científica forense, por ejemplo a las bases de datos de ADN para la identificación de desaparecidos, entre las que destacan los proyectos de identificación de víctimas de conflictos bélicos o de víctimas de catástrofes.

Por otro lado, las bases de datos poblacionales de marcadores de ADN humanos utilizados en genética forense (muchas de ellas públicas y accesibles por Internet) se han convertido en una herramienta esencial para poder realizar una evaluación bioestadística adecuada del valor de la prueba del ADN, tanto de marcadores STR autosómicos como de datos haplotípicos (Y-STR ó mtDNA).

Otras referencias son un grupo heterogéneo de bases de datos de ADN que emergen en los diversos ámbitos de aplicación de las ciencias forenses y que pueden ser de utilidad en muy diversos diagnósticos: la identificación genética de vestigios de distintas especies animales, la identificación de distintas especies tóxicas o patógenas, la identificación de mutaciones de los genomas humanos asociados a determinadas patologías asociadas a causas de muerte súbita, por poner algunos ejemplos.

Se debe tratar de mantener el derecho individual de cada persona. En el momento actual existen múltiples problemas de tipo técnico, científico, económico y social para llevar a cabo un proyecto de banco genético general para toda la población, por lo que no se plantea su elaboración. Sí se están realizando sin problemas en determinadas profesiones de riesgo en las que los profesionales de forma voluntaria y con consentimiento explícito donan una muestra de saliva o sangre para ser analizada en caso de accidente, con vistas a solucionar todas las cuestiones civiles que pueden presentarse ante la falta de identificación del cadáver o de sus restos. En todos los casos se aprecia un beneficio en la realización de este tipo de bancos; desde el punto de vista social se ha planteado la conveniencia de proceder al archivo de estas muestras en determinados individuos a manera de evitar un daño a la sociedad, concretamente la discusión se ha centrado en los casos criminales, hablando de la necesidad de proceder al archivo de todos los criminales autores de delitos graves, limitándolas en principio al homicidio y a las agresiones sexuales.

Las decisiones han variado según los países, y en la actualidad los dos únicos que tienen una base de datos genética de utilización rutinaria en los casos prácticos son Estados Unidos y Gran Bretaña. El primero sólo archiva el perfil de los criminales que han sido juzgados y condenados por agresiones sexuales, decidiendo instaurar este tipo de archivo debido fundamentalmente a la existencia de los denominados "violadores en serie" que tienden a repetir el mismo tipo de conductas y a las limitaciones para combatirlos, sobre todo por la movilidad y la diferente jurisdicción entre los distintos estados. El Reino Unido ha ido más allá y se procede al archivo de muestras biológicas de todas aquellas personas que se han visto envueltas en un hecho delictivo.

XIX DISCUSIÓN

Los avances tecnológicos en lo que se refiere a la genética forense, desde el punto de vista técnico, la actualización e implementación de nuevos métodos de ensayo y marcadores genéticos, de técnicas analíticas más sensibles y de equipos como analizadores y bio-robots, han estado evolucionando este rubro.

El progresivo y continuo aumento en la demanda de los análisis de ADN, sobre todo en la realización del perfilamiento genético de detenidos y sospechosos, hace preciso contemplar medidas tales como la asistencia técnica externa, de personal como de laboratorios, no debiéndose descartar la creación de un nuevo laboratorio central o incluso la creación de laboratorios periféricos.

La problemática actual del laboratorio es su adecuación a la gran demanda de asuntos solicitados por Unidades y Juzgados. La disponibilidad de infraestructuras, personal, métodos de ensayos y equipos, y de un sistema de gestión de la calidad adecuados, constituyen los recursos básicos y necesarios para garantizar el mejor servicio posible a nuestras Unidades y Juzgados, con una respuesta fiable y rápida, cuyo objetivo último es conseguir la plena confianza del ciudadano y de la sociedad en general.

Para cumplir con estos objetivos se debe contar con metodologías, que permitan la posible identificación de muestras biológicas, donde la capacitación del personal es primordial ya que la toma de muestra, su recolección, conservación, custodia y transporte, así como la técnica analítica seleccionada podrán dar una posible solución confiable.

Las bases de datos de ADN disponibles actualmente son de suma importancia, ya que son de gran ayuda para identificar al presunto responsable y también para la comparación de perfiles genéticos, los cuales nos podrán dar una perspectiva de que el perfil de la muestra analizada es parecida a la muestra que se encuentra en la base de datos, lo que permitirá tener una herramienta eficiente para reducir ciertos delitos.

XX. CONCLUSIÓN

El desarrollo de las técnicas de biología molecular específicamente la tipificación de ADN es una herramienta fundamental hoy en día en diversos campos de la vida humana, desde el campo médico hasta el criminalístico pasando por la antropología o la agricultura.

Se debe considerar que existe un gran avance con respecto a este ámbito, ya que la tecnología avanza día a día, por lo que es muy importante estar a la vanguardia.

Si bien actualmente la identificación genética es una de las pruebas más importantes al servicio de la justicia, hemos de reconocer que una de las principales limitaciones que tiene es el factor tiempo. A diferencia de otras pruebas de carácter de identificación de gran relevancia de épocas anteriores (como la huella dactilar), el análisis de ADN ofrece resultados pero no con la rapidez deseada, pues los protocolos exigen tiempos mínimos en el tratamiento de las muestras. Sin embargo, hemos asistido a una gran evolución de la genética molecular en las últimas décadas y por ello no debemos descartar que algún día quizá la «prueba del ADN» sea prácticamente inmediata.

Las bases de datos de ADN con fines de investigación criminal son actualmente las de mayor interés para los laboratorios forenses. Por la experiencia acumulada de diferentes países que han desarrollado una legislación específica se sabe que la comparación sistemática de los perfiles de ADN provenientes de distintas causas penales estructurados en una misma base de datos, son de gran ayuda a los órganos de gobierno como posible evidencia que permiten una posible resolución en un caso delictivo.

El objetivo del trabajo se cumplió, ya que contiene información actualizada relacionada con la Genética Forense, siendo este rubro de suma importancia en la impartición de justicia.

El conocimiento y desarrollo de dichas técnicas permitirá su comprensión y aplicación adecuadas.

XXI BIBLIOGRAFÍA

AKANE A, 1993, Shiono H, Matsubara K, Nakamura H, Hasegawa N, Kagawa M. "Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis". J. Forensic Sci. Vol. 38, No. 3, pp : 691-701.

ALBERTS B, 1994, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. "Biología Molecular de la Célula". Ediciones Omega S.A., Barcelona.

ANDERSON S. 1981 ,Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome, pp.290, 457 y 465.

BAECHTEL FS, 1989, "The extraction, purification and quantification of DNA". Proc. Of the Intl. Symp. On the Forensic Aspects of DNA Analysis. FBI Forensic Science Research and Training Center: Quantico, VA; pp 25.

J. BUCKLETON 2005, C. Triggs, S. Walsh. "Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press.

BUTLER J.M. 2001. *Forensic DNA Typing*. Biology and Technology Behind STR Markers. Academic Press. <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/>

CANN RL, 1988, "DNA and human origins". Ann. Rev. Anthropol, pp17:127.

CARRACEDO A. 1995. La huella genética. En (C. M. Romeo Casabona, ed.) "Genética humana. Fundamentos para el estudio de los efectos sociales derivados de los avances en genética humana", *Cátedra de Derecho y Genoma Humano, Universidad de Deusto, Fundación BBV, Diputación Foral de Bizkaia, Bilbao*, pp.295-326

CARRACEDO A. 2000, Bär W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G., Wilson M. DNA comisión of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Sci Int 110: 79-85.

CASTELLANO, M. (ed.) 1991. Distribución de las frecuencias de marcadores genético moleculares en población española. *Zaragoza*

CASTELLANO, M. 1995. Pruebas genéticas de investigación de la paternidad. En (C. M. Romeo Casabona, ed.) "Genética humana. Fundamentos para el estudio de los efectos sociales derivados de los avances en genética humana", *Cátedra de Derecho y Genoma Humano, Universidad de Deusto, Fundación BBV, Diputación Foral de Bizkaia, Bilbao*, pp. 269-294

CHOCLÁN, J.A. 1998. Pericia genética y proceso penal. *Rev. Derecho y Genoma Humano (Deusto, Bilbao)*, 9:59-90

DICKERSON R, Geis Y, 1969, "*The structure and action of proteins*", New York: Harper & Row, pp.59-66.

EWETT, I. 1987. Bayesian inference and forensic science: problems and perspectives. *The statistician*, pp. 36:99-105

FISHER DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wicox AW, Wadhams M, Weedn vW, 1993, "*Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone*". *J. Forensic Sci.* 38 (1): 60-68.

GILL y cols, 1985, "Forensic application of DNA fingerprints". *Nature*, 318, pp 577-579.

GILL P; Ivanov, P.; Kimpton C.; Piercy, R.; Benson, N.; Tully, G.; Evett, I, Hagelberg, E.; Sullivan, K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, 6:130-135

P. GILL 2000, "The less than 100 pg of DNA". *Forensic Science International*. 112(2000) 17-40.

GUILLÉN, M.; Pestoni, C.; Carracedo, A. 1998. Bases de datos de ADN con fines de investigación criminal: aspectos técnicos y problemas ético-legales. *Rev. Derecho y Genoma Humano (Deusto, Bilbao)*, 9: 137-158

JEFFREYS, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. 1985 a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73.

JEFFREYS, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. 1985 b. Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, 316:76-79

KLUG WS, Cummings MR. 1999. *Conceptos de Genética (5ªed)*.Ed. Prentice Hall Iberica. Madrid.

ORREGO, C.; King, M.C. 1990. Determination of familial relationships. En Innis, M.A. "PCR protocols", *Academic press, London*, pp. 416-426

SULLIVAN K.M.1991, Hopgood R., Lang B., Gill P. Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 12: 17-21.

WELLER, P.; Jeffreys, A.J.; Wilson, V.1984. Organization of the human myoglobin gene. *EMBO J.*, 3:439.

WILSON M.R.1995, Dizinno J.A., Polanskey D., Replogle J., Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 108: 68-74.

TULLY G. 2001, Bär W. , Brinkmann B., Carracedo A., Gill P., Parson W. et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* 124: 83-91.

<http://ystr.charite.de/>

<http://www.mitomap.org/>

<http://www.isfg.org>

http://es.wikipedia.org/wiki/Ant%C3%ADgenos_leucocitarios_humanos

<http://picasaweb.google.com/ghalilk/CriminalisticaSangreYSemen#5462676092229455282>

http://pdf.rincondelvago.com/criminalistica_2.html

<http://alvarezunahvs.files.wordpress.com/2009/11/tecnicas-o-metodos-de-laboratorio-manchas-de-sangre.pdf>

<http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>

<http://www.fcq-uach.com/espectroscopia/evuv.pdf>

XXII. 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.

Autosomas: Cualquier cromosoma diferente a los cromosomas sexuales X e Y. Las células somáticas humanas presentan 22 pares de autosomas (44 en total).

Cariotipo: Ordenamiento de la constitución cromosómica de un individuo basado en su número y morfología. En el caso de los humanos es 46 XX en el sexo femenino y 46 XY en el sexo masculino.

Cebador o Primer: 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.

CODIS: Siglas de “Combined DNA Index System”. Conjunto estándar de 13 marcadores STR utilizados por los laboratorios de investigación forense para obtener el perfil genético de una muestra biológica sometida a un análisis forense.

Cromatina: Material del que están compuestos los cromosomas (ADN y proteínas).

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.

Equilibrio Hardy-Weinberg: Estado de una población ideal en que las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones. Además, las frecuencias genotípicas están determinadas por las frecuencias génicas, mediante una expresión matemática bien determinada: en el caso de un gen o un marcador con solo 2 alelos, p^2 (Homocigoto para un alelo), $2pq$ (heterocigoto), q^2 (homocigoto para el otro alelo), siendo p y q , las frecuencias de los alelos en la población ideal.

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).

Heterocigosidad: Proporción de individuos heterocigotos para un gen o un marcador genético. Este parámetro proporciona una idea de lo polimórfico que puede ser un gen o un marcador genético.

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.

Locus/Loci (plural): 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 diploide por el que, tras dos divisiones consecutivas, resultan cuatro células hijas haploides, es decir, cada una de ellas posee un único miembro de cada par de cromosomas homólogos. Es característico de la gametogénesis.

Mitocondria: Orgánulo celular que contiene en su matriz un tipo de ADN circular que se hereda a través de las mujeres exclusivamente. En análisis forense se emplean marcadores genéticos del ADN mitocondrial para rastrear linajes femeninos.

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.

Múltiplex: 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: Siglas de Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa). 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.

Población ideal: Población “infinitamente grande”, en la que, para un determinado marcador genético o un gen, los cruzamientos son aleatorios, y sobre la que no actúan “fuerzas microevolutivas” (mutación, migración, selección natural, deriva genética).

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»): Tipo de marcador polimórfico de ADN consistente en variaciones en la longitud (nº de nucleótidos) de un segmento de ADN, generado al actuar una enzima de restricción sobre el ADN total de una célula.

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. Tipo de ADN repetitivo. (Repeticiones Cortas en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 2 y 6. En los análisis forenses se utilizan STR's cuya secuencia básica es de 4 nucleótidos.

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. Tipo de ADN repetitivo. (Número Variable de Repeticiones en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 7 y 100. Cada vez menos utilizados en genética forense.