



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

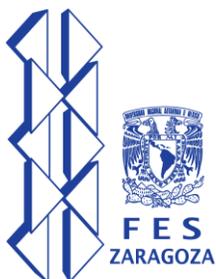
**“ANÁLISIS DE ADN HUMANO OBTENIDO DE MOSQUITOS
HEMATÓFAGOS (DE LA FAMILIA Cullisidae) CON FINES DE
IDENTIFICACIÓN HUMANA PARA POSIBLE APLICACIÓN EN
CASOS DE PRIVACIÓN ILEGAL DE LA LIBERTAD”**

TESINA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
AMADO ISRAEL DE LA CRUZ GALINDO**

DIPLOMADO EN QUÍMICA LEGAL



ASESORA: M. en C. MARIA LOURDES VEGA NAVARRETE

México 08 de Septiembre del 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	
	2.1.- ANTECEDENTES.....	2
	2.1.1. DESCUBRIMIENTO DE LA	
	MOLÉCULA DEL ADN.....	3
	2.1.2. LA ESTRUCTURA FINAL.....	5
	2.1.3. CIENCIA FORENSE Y LOS PRECURSORES DE LA	
	GENÉTICA FORENSE.....	6
	2.1.4. GENÉTICA FORENSE.....	6
	2.1.5. CRIMINALÍSTICA.....	7
	2.1.5.1. FUNCIÓN.....	8
	2.1.5.2. MUESTRAS DUBITADAS E INDUBITADAS.....	8
	2.1.6. LA CRIMINALÍSTICA EN MÉXICO.....	9
	2.1.7. ESCENARIO NACIONAL.....	9
	2.1.7.1. INCIDENCIA DELICTIVA.....	10
	2.1.8. PRIVACIÓN ILEGAL DE LA LIBERTAD.....	10
	2.1.8.1. SECUESTRO EXTORSIVO.....	11
	2.1.8.1.1. SECUESTRO ECONÓMICO.....	11
	2.1.8.1.2. SECUESTRO EXPRESS.....	11
	2.1.8.1.3. SECUESTRO VIRTUAL.....	11
	2.1.8.1.4. SECUESTRO POLÍTICO.....	11
	2.1.9. EL SECUESTRO EN MÉXICO.....	12
	2.2.CÓDIGO FEDERAL MEXICANO.....	12
	2.2.1.EL DERECHO A LA INTIMIDAD GENÉTICA.....	14

2.3. LA CÉLULA Y EL ADN.....	15
2.3.1. EL ADN COMO MATERIAL GENÉTICO Y HEREDITARIO. .	15
2.4. LA QUÍMICA DEL ADN.....	16
2.4.1. NUCLEÓTIDOS.....	17
2.4.2. CADENAS DEL ADN.....	18
2.5. GENOMA HUMANO.....	19
2.5.1. ESTRUCTURA.....	19
2.5.2. ADN CODIFICANTE Y NO CODIFICANTE.....	20
2.5.2.1. ADN DE COPIA SENCILLA	20
2.5.2.2. ADN DE COPIA MÚLTIPLE.....	21
2.5.3. SECUENCIAS REPETIDAS EN TANDEM	21
2.5.3.1. TIPO I.....	21
2.5.3.1.1. FAMILIAS SATÉLITE.....	22
2.5.3.1.2. SATÉLITE ALFOIDE.....	22
2.5.3.1.3. MIDISATÉLITES.....	22
2.5.3.2. TIPO II.....	22
2.5.3.2.1. MINISATÉLITES.....	22
2.5.3.2.1. MICROSATÉLITES.....	23
2.5.3.3. VENTAJAS.....	24
2.5.4. SECUENCIAS REPETIDAS INTERCALADAS.....	24
2.6. ADN COMO MATERIAL BIOLÓGICO EN LA JUSTICIA.....	24
2.6.1. CARACTERÍSTICAS.....	25
2.6.2. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL ADN REPETITIVO.....	25
2.6.3. EL ADN COMO HERRAMIENTA CIENTÍFICA.....	26
2.6.4. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS..	26
2.6.4.1. RFLPs.....	27
2.6.4.2. ANÁLISIS DE VNTRs.....	27

2.6.4.3. STRs EN LA GENÉTICA FORENSE.....	28
2.6.4.4. STRs EN CRIMINALISTICA.....	28
2.5.6. SELECCIÓN DE STRs COMO MARCADORES CON APLICACIÓN EN IDENTIFICACIÓN HUMANA.....	29
2.6. OTROS MARCADORES DE USO FORENSE.....	29
2.6.1. AMELOGENINA.....	29
2.6.2. CROMOSOMA Y.....	30
2.6.3. ADN MITOCONDRIAL.....	30
2.6.4. POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO.....	31
2.7. MARCADORES GENÉTICOS DE INTERÉS FORENSE.....	32
2.8. SISTEMA POWERPLEX 16 HS, 17ESX Y POWER PLEX FUSION....	33
2.9. VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE ADN.....	34
2.10. ESTANDARIZACIÓN EN GENÉTICA FORENSE.....	34
2.11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	35
2.11.1. COMPONENTES DE LA PCR.....	36
2.11.2. DETALLES EN EL PROCESO DE LA PCR.....	37
2.11.3. PROCESO ESTÁNDAR.....	38
DESNATURALIZACIÓN.....	38
HIBRIDACIÓN.....	38
EXTENSIÓN.....	38
MESETA O PLANTEAU.....	38
2.11.4. TERMOCICLADORES.....	39
2.11.5. USOS Y APLICACIONES.....	39
2.11.6. VENTAJAS.....	40
2.11.7. RIESGOS Y LIMITACIONES.....	40
CONTAMINACIÓN.....	40
DEGRADACIÓN.....	41

INHIBICIÓN.....	41
MODIFICACIÓN AL ADN.....	41
EXCESO DE SUSTRATO.....	41
2.11.8. ARTEFACTOS.....	41
BANDAS “STUTTER”.....	41
2.12. PCR EN TIEMPO REAL RT-PCR.....	42
2.13. ELECTROFORESIS CAPILAR.....	45
FUNDAMENTO.....	45
ABI PRISM 3100.....	46
VENTAJAS Y USOS DE LA EC.....	48
2.14. MOSQUITO.....	49
2.14.1. CLASIFICACIÓN.....	49
2.14.2. ANATOMÍA.....	49
2.14.3. ETAPAS DE DESARROLLO.....	50
2.14.4. CICLO GONODOTRÓFICO.....	51
2.14.5. ALIMENTACIÓN.....	52
2.14.6. VENTAJAS DE LOS INSECTOS EN ENTOMOLOGÍA	53
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	54
4. HIPÓTESIS.....	54
5. OBJETIVOS.....	55
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
6.1. PROCEDIMIENTO.....	57
EXTRACCIÓN.....	57
CUANTIFICACIÓN.....	59
AMPLIFICACIÓN.....	59
ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE ADN (SECUENCIACIÓN).....	60

7. RESULTADOS.....	61
8. DISCUSIÓN.....	72
9. CONCLUSIONES.....	71
10. ANEXO I. ELECTROFEROGRAMAS DE REFERENCIA.	74
11.- GLOSARIO.....	83
10. BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	90

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Para mis abuelitos, Andrea y Nico, por que con su amor, experiencia y ejemplo hacen de su familia seres increíbles, los amo.

Para mis padres, Silvia y Amado, por su amor incondicional, por sus regaños y amonestaciones, por sus caricias, por sus consejos, por siempre estar cuando más los necesito, los amo.

Para mis queridos hermanos, Kary y Omar, que son parte importante en mi vida diaria, mis mejores amigos, mis confidentes, por los muy buenos ratos, por lo que falta. Los amo

Para Mary, la madre de mi hijo, mi compañera incondicional en este viaje lleno de retos y obstáculos, Te Amo.

Un agradecimiento sincero a los integrantes de la familia Galindo Colín Tíos y Primos, por su apoyo y cariño los quiero.

Un agradecimiento al grupo de trabajo que encabeza la M. en C. Ma. Lourdes Vega Navarrete, mi asesora de tesis, por las facilidades y apoyo que contribuyeron a terminar el presente trabajo.

Gracias a la Vida por darme la dicha de encontrarme con personas increíbles que iluminan y dan sentido a mi existencia, gracias Dios.

En memoria de aquellos seres queridos con los que compartí un espacio en este universo.

Para Matías, mi adorado hijo, quien llena mi vida de amor.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
EC	Electroforesis capilar
dNTPs	Desoxirribonucleósido 5' – trifosfato
DTT	Ditiotreitol
Kb	Kilobase
ng	Nanogramos
mL	Mililitro
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de longitud para fragmentos de restricción)
STR	Short Tandem Repeat (repeticiones cortas en tándem)
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats (repeticiones en tándem en número variable)
SNPs	Single Nucleotid Polimorphism (polimorfismo de un solo nucleótido)
kV	Kilovatios
Tm	Tiempo de fusión.

1.- INTRODUCCIÓN.-

La privación ilegal de la libertad en el territorio Mexicano se ha incrementado en los últimos años, datos proporcionados por organizaciones no gubernamentales, demuestran un incremento del 20% al fin del año 2013 con respecto al año anterior¹. Siguiendo la línea delincencial del secuestro desde el punto de vista socioeconómico, las consecuencias son catastróficas, véase por ejemplo el presupuesto social dirigido al combate fallido contra dicho mal, arrojando fugas de capital que bien se pudieran invertir en equipo y capacitación de personal calificado.

Sin inmiscuirse en las causas que arrojan a cometer dichos delitos, el trabajo presente se centra en la obtención de indicios poco controlados por los organizadores y cabecillas de la delincuencia pero con importancia en la investigación científica, todo ello con la intención de colaborar y expandir el campo de la genética forense.

Para esto se hace uso de herramientas sofisticadas de alta tecnología, métodos y técnicas ya descritas con anterioridad en la historia pero con mejoras y renovaciones constantes. Tal es el caso del uso de las Repeticiones Cortas en Tándem (STR´s por sus siglas en inglés) que exhiben alto grado de polimorfismo, y se ha demostrado su utilidad en los casos de identificación humana. Siendo la Reacción en Cadena de la Polimerasa y la Electroforesis Capilar los métodos con los que se analizan las regiones hipervariables que se requieren estudiar respectivamente, ofreciendo precisión, sensibilidad, rapidez y resultados óptimos, a partir de vestigios que pueden encontrarse severamente dañados en cantidades críticas de ADN (picogramos).

El motivo de seleccionar al mosquito como indicio, es debido a las características morfológicas que presenta dicho insecto, desde su tamaño hasta la resistencia de su estructura a degradarse o destruirse con el tiempo, es decir, encontramos material biológico resistente al medio ambiente lo cual es de gran aportación para la obtención de material genético de amplio poder discriminatorio.

El análisis de un determinado número de fragmentos de ADN permite identificar a un ser humano con una probabilidad muy cercana al 100%. Además de ser altamente polimórfico, la parte del material genético que se analiza para este tipo de identificación, es denominado no codificante o no expresivo, por lo que no revela características fenotípicas; hecho importante para las consideraciones éticas y legales.



2.- MARCO TEÓRICO.

2.1. ANTECEDENTES

La introducción de las técnicas del ADN al campo de las ciencias forenses data de 1980 a partir del descubrimiento del primero locus del ADN polimórfico por Wyman y White. La característica clave de este descubrimiento fue la gran variabilidad que presentaba de un individuo a otro, direccionándolo inmediatamente a la aplicación con fines de identificación humana. A partir de entonces, se utilizan las técnicas basadas en el análisis de los locus del ADN polimórfico no codificante, convirtiéndose en una herramienta cada vez más exacta, con gran sensibilidad proporcionando resultados veraces y confiables.^{4, 5}

Con respecto a la primera aplicación de la denominada “tecnología del ADN” en la resolución de un caso judicial, se presentó en el año 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. El encargado del caso fue Alec J. Jeffreys, profesor de Genética en la Universidad de Leicester, que utilizó como herramienta la técnica de los denominados RFLP (Polimorfismo de longitud para fragmentos de restricción), que son regiones minisatélites hipervariables dispersas por el genoma humano que al ser tratadas con enzimas de restricción generaban fragmentos de longitud variable. Estudios posteriores realizados por el propio Jeffreys demostraron que las diferencias en el tamaño de estos fragmentos se debían a que estas regiones consistían en un determinado número de repeticiones en tándem de una secuencia central, encontrando variación entre personas, excepto en gemelos univitelinos.⁵

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.⁵



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 pericia 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 pruebas en los tribunales de justicia.⁵

La mayor parte de los análisis de identificación genética humana se centra 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 el cromosoma Y) está ganando un creciente interés debido a sus especiales particularidades.⁵

2.1.1. Descubrimiento de la molécula del ADN.

El 25 de abril de 1953 se publicó en la revista inglesa Nature uno de los artículos científicos más importantes de la historia. Se titulaba “Estructura molecular de los ácidos nucleicos. Una estructura para el ácido nucleico de desoxirribosa”, y estaba firmado precisamente por J.D. Watson y F. H. C. Crick; haciéndose ganadores, nueve años después, del premio Nobel de fisiología y medicina.^{2, 11}

El artículo fue la culminación del trabajo de muchas personas durante varios años; marcando formalmente el nacimiento de la genética molecular. Constituye, junto con la formulación de la teoría de la selección natural de Darwin, o de la teoría celular por Schleiden y Swann, uno de los hitos decisivos en la historia intelectual de las ciencias biológicas.^{2, 3, 11}

Al igual que las especies biológicas, las ideas no surgen espontáneamente de la nada, evolucionan a partir de ideas anteriores, generadas en otros cerebros. También mutan y se combinan unas con otras; producen descendencia variada que luego es seleccionada, en parte, por su capacidad para colonizar nuevas mentes, pero sobre todo, en el caso de la ciencia, para ajustarse a eso que llamamos realidad.³

El descubrimiento de la doble hélice surge, principalmente, de dos linajes de ideas. Uno proviene de la genética y se remonta a los conceptos de los antiguos griegos sobre la pangénesis, que suponía que ciertas secreciones del cuerpo de los padres se mezclaban para dar origen a un hijo. El otro son los estudios acerca de la química del material hereditario.³



En el siglo XIX hubo varias teorías que buscaban explicar la transmisión de caracteres hereditarios de padres a hijos. Una de ellas, un refinamiento de la pangénesis, fue desarrollada por Charles Darwin. Pero la genética sólo se formalizó como estudio científico con los trabajos del monje austriaco Gregor Mendel, publicados en 1866 en la revista Sociedad de Ciencias Naturales de Brno. En ellos demostraba la existencia de unidades hereditarias que se transmitían de padres a hijos sin mezclarse y siguiendo unas leyes sencillas. Pero no fue hasta cuarenta y cuatro años después cuando los científicos Hugo de Vries, Karl Correns y Erich von Tschermak, retomaron los estudios previos de Mendel. A partir de ese momento fue quedando cada vez más claro que para entender a fondo la herencia había que desentrañar el funcionamiento de estas unidades que el botánico danés Wilhelm Johannsen denominaría *genes* en 1909.³

A partir de entonces, y hasta 1953, los avances en la genética habían sido hechos por medio de cuidadosas cruces, usando animales, plantas y microorganismos. Por el año de 1944 el médico canadiense Oswald Avery comprobó que los genes no están hechos de proteínas, como muchos pensaban, sino de una sustancia que el bioquímico alemán Friedrich Miescher había descubierto en 1869 (nucleína). Esta sustancia se hallaba en el núcleo celular, tenía propiedades ácidas y entre sus componentes estaba un azúcar llamado *desoxirribosa*, conocida en su conjunto como *ácido desoxirribonucleico*.²

Después de este descubrimiento la cuestión que surgió fue el cómo estaba construida esa molécula de ADN. Después de todo, tenía que ser una molécula muy especial con dos propiedades únicas. En primer lugar, es capaz de almacenar la información genética para formar un organismo completo, ya sea una bacteria, un hombre, un pino o una ballena azul. En segundo, la propiedad más sorprendente, pues es quizá lo más fundamental para la vida: el ADN puede reproducirse, fabricar copias de sí mismo. Hasta ese momento, no se conocía ninguna molécula, por complicada que fuera, que pudiera cumplir con estos requisitos.^{2,3}

Para 1951, ya se conocían algunos detalles sobre la estructura de la intrigante molécula. Se sabía que contenía carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. También se sabía que está formada por largas cadenas de unidades llamadas *nucleótidos*.^{2,3}

El último gran aporte de la química tradicional en la ruta hacia la doble hélice fue el trabajo realizado por el bioquímico austriaco Erwin Chargaff, quien entre 1948 y 1952 estudió, mediante cromatografía en papel, las proporciones de las cuatro bases en el ADN; dando paso a las reglas de Chargaff: la cantidad de adenina es siempre equivalente a la de timina y la de guanina a la de citosina. Ésta fue una de las pistas clave que permitieron a Crick y Watson concretar su modelo.^{2,3,11}



2.1.2. La estructura final

Linus Pauling, considerado el mejor químico del mundo, había desarrollado la teoría del enlace químico. Partiendo únicamente de principios químicos, Pauling demostraba la forma que podían adoptar algunas moléculas de proteína; auxiliado de modelos tridimensionales. Los había manipulado hasta encontrar una configuración que no violara las reglas químicas y a la vez pudiera explicar la estructura de las proteínas. Su modelo conocido como hélice alfa fue todo un éxito. Su estabilidad se debía a la formación de enlaces químicos débiles (llamados puentes de hidrógeno) entre partes distintas de una misma cadena de proteína. ²

Con la colaboración del estudio de cristalografía de rayos X juntamente con los conocimientos acumulados acerca de la química del ADN, se aplicó para develar la estructura de la doble hélice. Se concluye la estructura en una hélice formada por dos cadenas corriendo en forma antiparalela. Las bases nitrogenadas forman pares específicos en el centro, unidos por puentes de hidrógeno: la adenina se une a la timina y la guanina a la citosina. Se explican así las leyes, antes mencionadas de Chargaff, y al mismo tiempo se veía claramente como cada cadena podía servir de molde para construir otra idéntica, proporcionando así una base para entender la replicación del ADN. ³



Fig. 1 James Watson y Francis Crick. Disponible en <http://blogs.nature.com/>
Citado septiembre 2013



2.1.3. Ciencia Forense y los precursores de la genética forense

La palabra Forense proviene del latín *forensis*, “pertenecientes o relativo al foro”, aludiendo a la antigua Roma donde en el caso de un crimen se presentaba ante un foro con personajes especializados en el tema con capacidad de dar el veredicto. Dado los inicios de las investigaciones científicas, donde en la mayoría de los casos se veía involucrada la medicina, se comienza a denominar como Medicina Forense a dichas investigaciones. Con el paso del tiempo y la necesidad de ir especializando la ciencia forense se derivan disciplinas de apoyo tales como la Criminología, Criminalística, Genética forense, entre otras. Dando así inicio a una disciplina especializada con sus aristas encargadas de estudiar, verificar, proporcionar mayores y mejores resultados en el estudio de un hecho delictuoso.

La hemogenética Forense basada en el sistema ABO de los hematíes (descrita por Karl Landsteiner), funge como una rama de la criminalística cuyo objetivo era la identificación genética en casos de investigación criminal. Inicialmente, las investigaciones se centraban en el estudio de antígenos (sistema ABO, RH, MN), proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y sistema HLA. Con el estudio de dichos marcadores podía incluirse o excluirse una persona como posible sospechoso por poseer una combinación genética igual o diferente a la del vestigio biológico.^{4, 5}

Fue a mediados del siglo XX cuando debido a la develación de la estructura del ADN y al posterior avance en la técnicas de análisis de dicha molécula la Hemogenética Forense evolucionó considerablemente hasta el punto de hoy en día puede hablarse de una nueva especialidad la “**Genética Forense**”.⁵

2.1.4. Genética Forense

La **Genética Forense** es una especialidad que se basa en el estudio de la transmisión de los caracteres hereditarios y el análisis de la variabilidad genética humana aplicada a la resolución de problemas judiciales. Precisa con alto grado de certeza la relación biológica entre los individuos, como en los casos de parentesco; o bien, entre la evidencia biológica recuperada del lugar de los hechos y el o los probables responsables.^{6, 12}

Detalles estudiados por esta especialidad demuestran la gran utilidad del ADN como herramienta en investigaciones criminales, aportando información que ninguna otra técnica proporciona. Por lo que demuestra la utilidad de la tecnología del ADN comprobando que no es un simple método de exclusión-inclusión, sino un método de identificación prácticamente absoluta (excluyendo a los gemelos homocigotos).^{6, 12}



2.1.5. CRIMINALÍSTICA

Uno de los campos del conocimiento que se ha enriquecido gracias al desarrollo de los métodos de identificación humana es sin duda, la *criminalística*, que se encarga del estudio del indicio físico y que tiene por objeto la identificación de los involucrados y la reconstrucción del probablemente constitutivo del delito para proporcionar los elementos suficientes al juez con el fin de que se imparta justicia.⁶

La criminalística suele confundirse con la criminología o ser catalogadas como lo mismo; sin embargo, la criminalística investiga un probable hecho delictuoso a través del estudio técnico – científico del lugar de los hechos (criminalística de campo), dando respuestas a las interrogantes de qué, cómo, dónde, cuándo y con qué, mientras la criminología responde al porqué, del quién, del delito.⁹

La Criminalística, considerada en el pasado una disciplina auxiliar del derecho penal, en el presente, gracias a los avances de ciencia y de la técnica de las cuales se nutre, se considera una pieza fundamental del procedimiento penal, brindando información veraz y objetiva.¹⁰

Su método de trabajo, así como las técnicas que aplica, permiten al investigador, no perderse en el transcurso de la indagación; concluyendo con identificar y conocer la naturaleza de los indicios, que son, en última instancia, su *objeto formal de estudio*, a los cuales Edmond Locard, el gran policólogo francés, calificó de “Testigos mudos que no mienten” y que por lo tanto, permiten, mediante su correcta interpretación, reconstruir los hechos delictuosos e identificar a su o sus autores.¹⁰

La *historia de la criminalística* se clasifica en dos etapas desde sus orígenes franceses hasta la actualidad:^{7,8}

- Etapa equivoca: Eugene Francois Vidoq (1811)
- Etapa científica: Alphonse Bertillon (1879), Juan Vucetich (1892), William Herschel, Francois Galton.

Hanns Gross (1847-1915), considerado como el padre de la criminalística actual, centra la definición al “análisis sistemático de las huellas dejadas por el culpable”. Entre sus principales aportaciones al campo tenemos la elaboración del “Manual del Juez como Sistema de Criminalística, y su método científico “escuela criminológica de Graz”.^{7,8,10}



2.1.5.1. Función.

Una de las preponderantes utilidades de la criminalística en el proceso o desarrollo de la búsqueda de la resolución del delito, es sin duda, la de recabar todo material útil en el lugar de los hechos o el lugar del hallazgo; es por ello la gran importancia de la recogida, transporte y condiciones de conservación de los vestigios biológicos en las etapas previas a su llegada al laboratorio. ⁷

2.1.5.2. Muestras dubitadas e indubitadas.

Las muestras con las que se trabaja en criminalística son de dos tipos:

- Muestras dubitadas o evidencias.- son restos biológicos de procedencia desconocida, es decir, no se sabe a quién pertenece (por ejemplo las muestras recogidas en la escena del delito).

Las muestras dubitadas que con mayor frecuencia se analizan por técnicas genético moleculares son: sangre, depositada en manchas o en estado líquido; semen, lavados vaginales o manchas sobre prendas de la víctima; saliva, colillas de cigarro, chicles, sobres y sellos; pelos, uñas, tejidos blandos, restos óseos y dentarios.

- Muestras indubitadas o de referencia.- son restos biológicos de procedencia conocida, es decir, se sabe de dónde o de quién es la muestra. Entre las comúnmente utilizadas en genética forense se encuentra las muestras de sangre en FTA y saliva en un hisopo.



Fig. 2 Indicios indubitados. <http://timerime.com/es> Citado Septiembre 2013

2.1.6. LA CRIMINALÍSTICA EN MÉXICO

En México el profesor Carlos Roumagnac en 1904 escribió los primeros fundamentos de Antropología Criminal. En 1920, el profesor Benjamín Martínez funda en la ciudad de México el gabinete de identificación y el laboratorio de criminalística en la entonces jefatura de la Policía del Distrito Federal.^{13, 14}

En 2008 en México se aprobó “El proceso penal acusatorio oral”, que se regirá por los principios de publicidad, contradicción, concentración, continuidad e inmediación; que aludirá al Sistema de Justicia Penal Acusatorio que dará inicio a nivel nacional para el año 2016.⁹

2.1.7. ESCENARIO NACIONAL

Organizaciones no gubernamentales destacan que durante el año 2013 se denunciaron 2 mil 663 secuestros. De acuerdo a datos proporcionados por la ONG del 1 de diciembre de 2012 al 18 de diciembre de 2013 se tienen contabilizados 2 mil 235 plagios atendidos por alguna autoridad, mientras que 428 no fueron denunciados.¹

La cifra es la más alta desde 1997, cuando se empezó a contabilizar la incidencia de delitos de alto impacto. Del total de los privados de la libertad, 68% son comerciantes, asalariados, estudiantes y profesionistas. Asimismo, el 71% de las personas plagiadas son varones y la edad de la mayor parte de las víctimas es de 21 a los 30 años.¹



2.1.7.1. INCIDENCIA DELICTIVA

En contraste con los datos recuperados por organizaciones no gubernamentales especializadas en el seguimiento del secuestro, la Procuraduría General de la República reportó en 2013 un total de 1, 527, 532 delitos de los cuales se resaltan los siguientes.^{1, 15}

DELITO	2011	2013
Robos (con y sin violencia)	750,590	635,091
Lesiones (dolosas y culposas)	211,821	183,471
Homicidios (dolosos y culposos)	37,423	31,532
Delitos patrimoniales	131,199	215,618
Privación de la libertad (Secuestro)	1,327	1,583
Delitos Sexuales (violación)	14,978	12,266
Otros delitos	543,620	457,961

Tabla 1. Fuente: elaborado con la información remitida por los agentes de los ministerios públicos hasta el 17 de diciembre del 2013^{1, 15}

2.1.8. PRIVACIÓN ILEGAL DE LA LIBERTAD (Secuestro).

“Se entiende por secuestro al apoderamiento ilegal de una persona por medio de la violencia para privarle de su libertad y exigir la recompensa con un fin político o social, del secuestrador”.^{16, 17}

Existe una Declaración Universal de los Derechos Humanos adoptada y proclamada por la Asamblea General de las Naciones Unidas en su resolución 217 (III) del 10 de diciembre de 1948 que rige actualmente, la cual está suscrita por México y en la que sus artículos 1, 3, 5 y 9 plasman que todos los seres humanos tienen derecho a su libertad, seguridad y no podrán ser privados arbitrariamente de estas, por lo tanto, el secuestro es un delito que sustenta una violación a dichas cartas.¹⁶



El acto del secuestro tiene vigencia desde los tiempos primitivos cuando, según la tradición, hubo casos innumerables de secuestros de príncipes y princesas; no solamente con el propósito de obtener beneficios y recompensas en especie y dinero, sino también para fijar condiciones de guerra.^{16, 17}

Ya el Deuteronomio (libro bíblico del Antiguo Testamento y del Tanaj Hebreo), lo contemplaba y lo castigaba con pena capital.^{16, 17}

Julio César, fue secuestrado durante la República Romana cuando se dirigía a Britania. Sus secuestradores eran piratas, que pidieron por él un rescate, que Julio César consideró escaso y los obligó a pedir más por su persona, considerando que pedir poco monto, lo desmerecería. Una vez liberado, luego de 38 días de privación se preocupó Julio Cesar de atacar a los piratas y recuperar lo pagado. Como castigo hacia sus raptos los dejó libres a su suerte en medio de la nada.¹⁶

El secuestro es uno de los delitos con mayor afectación social. La conducta repercute en un fuerte impacto psíquico y moral, donde sus manifestaciones desbordan en crueldad hacia las víctimas.^{16, 18}

El secuestrar personas conlleva a la obtención de grandes recursos económicos, por lo que la proliferación de organizaciones delictivas dedicadas a esta actividad ilícita ha ido en aumento, convirtiéndose en una verdadera industria delictiva.^{16, 19}

2.1.8.1. Secuestro extorsivo.- es el tipo de secuestro que se caracteriza por sustraer, retener u ocultar a una persona, con el fin de exigir por su libertad algún provecho. Dentro de este mismo rubro se puede subdividir en:^{16, 19}

2.1.8.1.1. Económico: Responsivo de los resentimientos sociales o producto del secuestro y extorsión. Este tipo de plagio es el más usual.^{16, 19}

2.1.8.1.2. Secuestro Express: Es la retención de una o más personas por un período corto de tiempo, durante el cual, los delincuentes exigen dinero a los familiares de las víctimas para su liberación.^{16, 19}

2.1.8.1.3. Secuestro Virtual: Tipo de secuestro que no se lleva a cabo físicamente, en donde los plagiarios aprovechan la ausencia de la víctima para extorsionar a los familiares con montos económicos pequeños.^{16, 19}

2.1.8.1.4. Político: Se caracteriza por el chantaje al gobierno para presionar causas pérdidas, especialmente en grupos subversivos y narcotraficantes.^{16, 19}



2.1.9. EL SECUESTRO EN MÉXICO

En México durante el siglo XIX, el secuestro comienza a instituirse a partir del código penal de 1871 en su artículo 626 que dice: el delito de plagio se ejecuta, apoderándose de otro por medio de violencia, de amagos, de amenazas, de la seducción y del engaño y su penalidad podría alcanzar hasta la pena capital.^{16, 17}

Uno de los factores generadores de violencia en México fue en un principio, el nivel de pobreza y desempleo aparte del mal manejo jurídico con el cual se juzgan dichos actos. En la actualidad operan más de 400 bandas delincuenciales dedicadas al secuestro. Los secuestradores han modificado las estrategias y ampliado el campo del perfil del plagiado, ahora secuestran desde un importante empresario hasta un menor de edad de medianos recursos económicos.^{16, 17}

En el país, el delito se paga con una condena máxima de 70 años de cárcel. Sin embargo, la mayoría de los plagiarios no son detenidos. Conjuntamente por tratarse de una Federación, cada Estado puede tener una legislación diferente para este tipo de delitos.^{16, 17, 19}

México hasta finales del 2013, ocupa el primer lugar en secuestros en todo el mundo. El incremento se ha dado en parte, a la poca atención y estrategias fallidas de las instituciones encargadas del salvaguardo de la sociedad.²¹

2.2. CÓDIGO FEDERAL MEXICANO

El delito del secuestro se encuentra tipificado dentro del libro segundo denominado, Privación Ilegal de la Libertad y de otras garantías.^{19, 20}

Artículo 364^{19, 20}

Se aplicará la pena de seis meses a tres años de prisión y de veinticinco a cien días de multa.

- I. Al particular que prive a otro de su libertad hasta por cinco días. Si la privación de la libertad excede de cinco días, la pena será de un mes por cada día.

La pena de prisión se aumentará hasta en una mitad, cuando la privación de la libertad se realice con violencia, cuando la víctima sea menor de dieciséis o mayor de sesenta años de edad, o cuando por cualquier circunstancia, la víctima este en situación de inferioridad física o mental respecto de quien la ejecuta.



- I. Al que de alguna manera viole, con perjuicio de otro, los derechos y garantías establecidos por la Constitución General de la República a favor de las penas.

Artículo 366 ^{19, 20}

Al que prive de la libertad a otro se le aplicará:

- I. De quince a cuarenta años de prisión y de quinientos a dos mil días multa, si la privación de la libertad se efectúa con el propósito de:
 - a) Obtener rescate.
 - b) Detener en calidad de rehén a una persona y amenazar con privarla de la vida o con causarle daño, para que la autoridad o un particular realice o deje de realizar un acto cualquiera.
 - c) Causar daño o perjuicio a la persona privada de la libertad o a cualquier otra.
 - d) Cometer secuestro exprés, desde el momento mismo de su realización, entendiéndose por este, para ejecutar los delitos de robo o extorsión, prive de la libertad a otro, lo anterior, con independencia de las demás sanciones que conforme a este código le correspondan por otros delitos que de su conducta resulten.
- I. De veinte a cuarenta años de prisión y de dos mil a cuatro mil días de multa, si en la privación de la libertad a que se hace referencia en la fracción anterior concurre alguna o algunas de las circunstancias siguientes:
 - a) Que se realice en camino público o en el lugar desprotegido o solitario.
 - b) Que el autor sea o haya sido integrante de alguna institución de seguridad pública, o se ostente como tal sin serlo.
 - c) Que quienes lo lleven a cabo obren en grupo de dos o más personas.
 - d) Que se realice con violencia.



2.2.1. El Derecho a la Intimidad Genética

El Derecho a la Intimidad Genética encuentra su fundamento en diversos textos nacionales e internacionales. En la constitución si bien no se halla expresamente recogido, puede derivarse del “principio” de respeto al Derecho a la Intimidad (art. 18.1 CE), según la Comisión Europea.^{22, 23}

Existen varios supuestos en los que se plantea el problema concreto de si es admisible la limitación del Derecho a la intimidad genética en atención a otros derechos o bienes jurídicos, como lo son: parientes carnales; filiación; “**persecución de delitos**”; entre otros.^{22, 23}

Se alega como fundamento para limitar el derecho a la intimidad genética la persecución de delitos (art. 25.1 CE). Esta argumentación es poderosa por cuanto que el precepto que hace posible la limitación de ciertos derechos fundamentales en aras a la acción penal de la justicia tiene una posición formal comparable a la del Derecho a la Intimidad genética.^{22, 23}

La jurisprudencia constitucional no ampara frente a la resolución judicial que, en el caso de una investigación penal, disponga la obtención o identificación, sobre el propio cuerpo, de huellas del posible delito que se investigue, sin perjuicio del necesario respeto a la dignidad de la persona y a su intimidad frente a todo trato que pudiera considerarse degradante. Por eso, ni la intimidad puede, en tales supuestos, ser un muro infranqueable frente a la búsqueda de la verdad material que no pueda ser obtenida de otro modo; además de que el ADN que se utiliza para este tipo de identificación, es un ADN no codificante o no expresivo, por lo que no revela características fenotípicas de individuos, hecho importante a la hora de generar bases de datos y en cuestiones legales.^{22, 23}

“**La huella genética**” como prueba pericial, se justifica por razón de su necesidad y proporcionalidad para el estudio de ciertos delitos (delitos contra la vida y la integridad física), haciendo hincapié en el estudio del genoma no codificante.^{22, 23}



2.3. LA CÉLULA Y EL ADN

2.3.1. El ADN Como Material Genético y Hereditario ^{5, 24}

La unidad básica de la vida es la célula, que produce 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. ^{5, 24}

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 *cromosomas*, que son unas estructuras muy densas formadas por ADN y proteínas. El genoma humano nuclear consiste en 22 pares de cromosomas *autosómicos* y un par de cromosomas sexuales, X y Y, cuya combinación determina el sexo femenino (XX) o masculino (XY). En conjunto, cada célula somática contiene 46 cromosomas. ^{5, 24}

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. ^{5, 24}

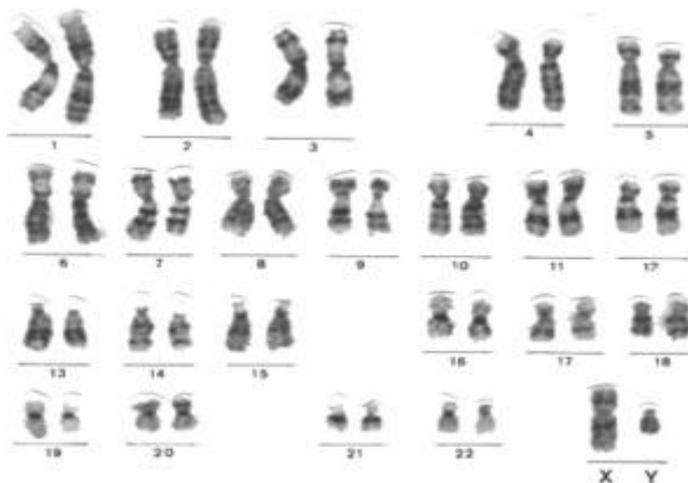


Fig. 3. 46 cromosomas agrupados en 23 pares <http://reconceptualizandolaexperiencia> Citado Sep. 2013



2.4. La Química del ADN

El ADN es una molécula de doble cadena de nucleótidos, arreglados en forma antiparalela y complementaria, unidas entre sí por puentes de hidrógeno entre los nucleótidos: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). La forma en las que se aparean las bases es la siguiente: ^{25, 26}

A = T mediante dos puentes de hidrógeno

Mientras que:

G ≡ C mediante tres puentes de hidrógeno

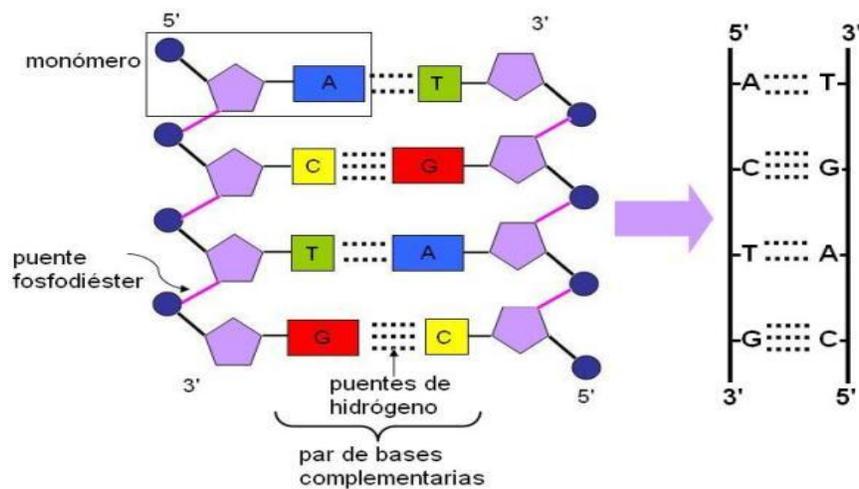


Fig. 4 Estructura interna del ADN http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/ Citado Sep. 2013

Los puentes de hidrógeno se forman entre un átomo de hidrógeno enlazado con un átomo electronegativo (O, C, N) y un segundo átomo electronegativo. ^{24, 25, 26}

Durante la replicación o duplicación, las dos hebras simples se separan y cada una de ellas forma una nueva hebra complementaria, incorporando bases nuevas; de esta manera se obtienen una nueva molécula de ADN idéntica a la original con el mismo material genético conteniendo éste, toda la información necesaria para controlar todas las funciones celulares y del organismo. ^{24, 25, 26}



2.4.1. Nucleótidos.-

Cada nucleótido está formado por una molécula de azúcar desoxirribosa (no posee O_2 en el sitio 2', únicamente un H) una base orgánica nitrogenada, pirimidinas para citosina y timina o purinas para adenina y guanina, y el grupo fosfato. ²⁶

El tipo de enlace con el cual se enlazan los nucleótidos es de tipo covalente fosfodiéster entre el grupo fosfato de la posición 5' con el grupo OH ubicado en el sitio 3' del nucleótido anterior. En este tipo de enlaces se comparte un par de electrones entre dos átomos, a su vez los núcleos de cada uno de los átomos atrae dicho electrón haciendo que el enlace sea muy fuerte, que dependiendo del tipo de átomos, la energía puede llegar a 263 KJ/mol para un enlace C – P hasta 460 KJ/mol para un enlace O – H. Esto hace que la molécula de ADN sea estable en condiciones tanto intra como extracelulares. Los enlaces covalentes que unen a cada subunidad de nucleótido son químicamente estables y no son susceptibles de experimentar ruptura hidrolítica en el medio acuoso de la célula. Esto establece una forma segura y duradera de almacenamiento de la información genética, que no debe alterarse ni dañarse de generación en generación. Es por esta razón que se ha podido extraer ADN en buenas condiciones de especímenes de museos y muestras arqueológicas de varios millones de años. ²⁶

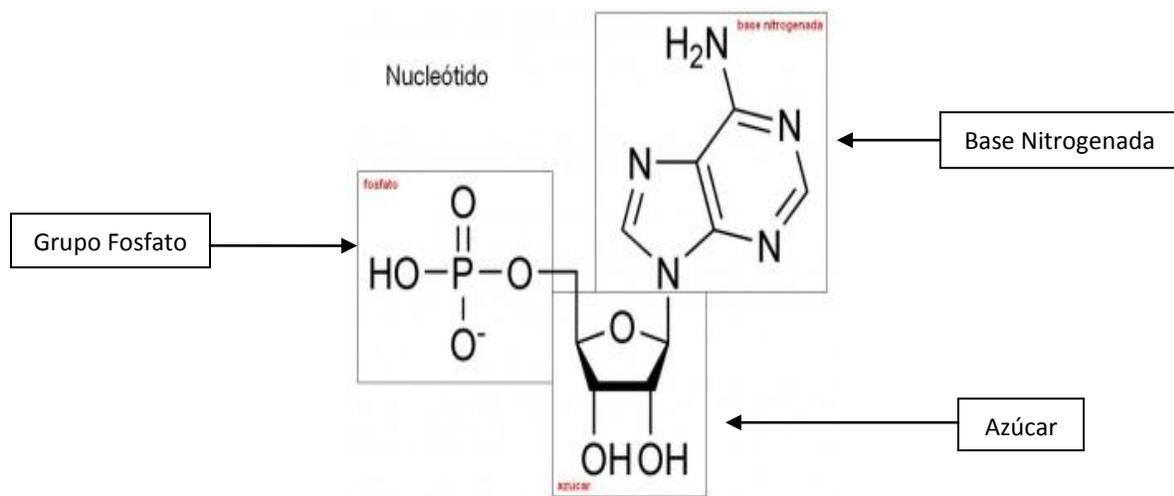


Fig. 5 ILUSTRACIÓN OBTENIDA DE LA WEB http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/ Citada Sep. 2013



2.4.2. Cadenas del ADN

Una vez terminada una cadena, en el extremo 5' queda un grupo fosfato y en el extremo 3' un grupo OH.^{24, 26}

Esta disposición lleva las bases orgánicas al interior de la doble hélice. Las bases adyacentes de la misma hebra se apilan unas sobre otras (como peldaños de escaleras en espiral), esto permite la formación de interacciones hidrofóbicas, en las que la presencia de agua obliga a los grupos no polares a distribuirse para ordenadamente evitarla, las cuales tienen una energía de estabilización de 5 – 30 KJ/mol, e interacciones de Van der Waals, formadas entre moléculas con dipolos transitorios inducidos por fluctuaciones de electrones, ocurriendo entre cualquier par de átomos que estén muy cercanos con una energía de 1 – 5 KJ/mol.^{26, 27}

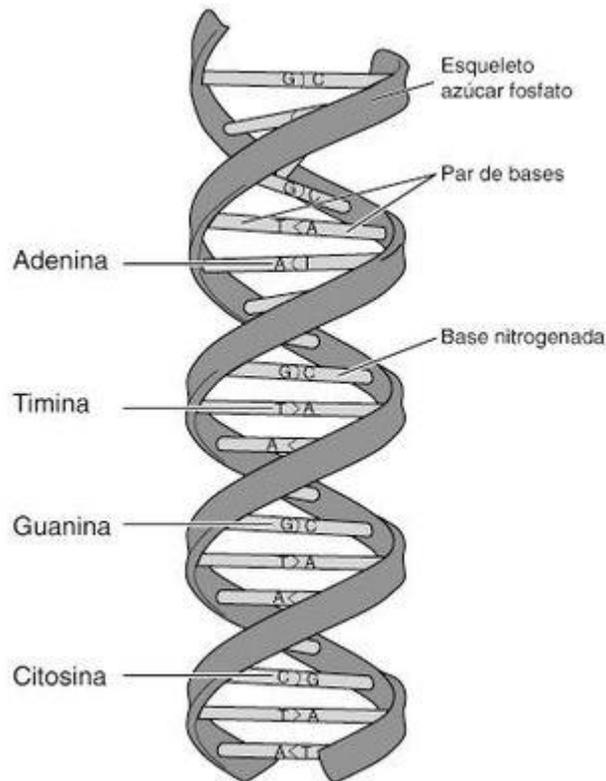


Fig. 6 National Human Genome Research Institute <http://www.genome.gov/> Octubre 2013

Las dos cadenas permanecen unidas mediante un proceso conocido como *hibridación*; que es la 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 del 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*.^{26, 27}

2.5. GENOMA HUMANO

2.5.1. Estructura.-

El genoma humano está constituido por unos 3.000 millones de pares de bases, donde sólo el 2% del ADN humano es codificante, es decir, 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 la que ocurre en el ADN codificante, que puede 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*, 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) o *microsatélites* (unidad de repetición 2 a 6 nucleótidos).^{5, 28}



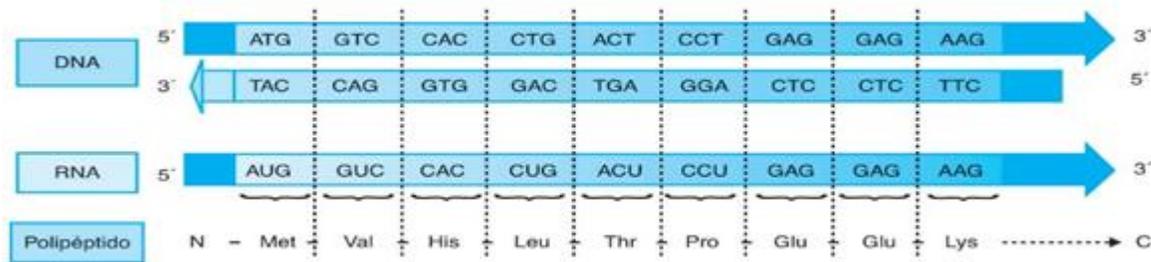


Fig. 7 Fragmento de la secuencia nucleotídica del gen de la cadena β de la hemoglobina <http://www.manualmoderno.com>

Citado Octubre 2013

2.5.2. ADN CODIFICANTE Y NO CODIFICANTE

ADN CODIFICANTE.- proporciona la mayoría de la información genética esencial, que en su mayor parte es decodificada para especificar la síntesis de polipéptidos en los ribosomas citoplasmáticos. Cabe mencionar que en el ADN mitocondrial casi todos los polipéptidos mitocondriales vienen codificados en genes nucleares y son sintetizados en ribosomas citoplasmáticos antes de ser importados por la mitocondria.⁴

ADN NO CODIFICANTE.- no se le han relacionado funciones de síntesis de proteínas, sin embargo es una herramienta esencial para la investigación forense por toda una serie de características y particularidades que hacen de él un elemento vital para la identificación humana.⁴

Existen dos tipos:

- **2.5.2.1. ADN de copia sencilla o no repetitivo:** actúa como ADN espaciador entre las regiones codificadas del genoma.⁴

Dentro de las secuencias no repetitivas se encuentran los *intrones*, los cuales no contienen información útil para la síntesis de la cadena polipeptídica y son eliminados durante el proceso de “*splicing*”. En las regiones que flanquean a los genes y en las zonas espaciadoras se han encontrado también secuencias extensas de ADN cuya función se desconoce. Las secuencias repetitivas se han encontrado en zonas como los orígenes de replicación los cuales son necesarios para el inicio de la replicación al entrar en la fase “S” del ciclo celular (Huberman 1995).⁴



- **2.5.2.2. ADN de copia múltiple**, denominándose ADN repetitivo ⁴

EL ADN repetitivo ha sido clasificado a su vez en diferentes tipos basándose en su organización estructural y frecuencia de reiteración de cada clase o tipo. Existen dos grandes clases, las **secuencias repetidas en tándem** y las **secuencias repetidas intercaladas**, importantes para la identificación humana.⁴

2.5.3. SECUENCIAS REPETIDAS EN TANDEM.

Comparte del 5 – 10% del genoma humano, se caracterizan por la presencia de una secuencia común repetida en tándem de manera continua en un fragmento de ADN. Son características de los *centrómeros* y *telómeros* y parece que tienen la función para determinar la estabilidad y la posición correcta de los cromosomas. Se encuentran distribuidas en el genoma de dos maneras: ^{4, 5, 29}

TIPO I: en grandes bloques caracterizados por una disposición repetida en tándem de diversas unidades. ⁴

TIPO II: En pequeños bloques con la misma disposición en tándem formados por la misma unidad básica y dispersos por todo el genoma.⁴

REPETICIONES EN TANDEM ⁴			
	GRADO DE REPETICIÓN (POR LOCUS)	NÚMERO DE LOCI	LONGITUD DE LA SECUENCIA CONCENSO
SATÉLITES	$10^3 - 10^7$	1 – 2 POR CROMOSOMA	1 – VARIOS MILES DE PARES DE BASES
MINISATÉLITES	$10 - 10^3$	VARIOS MILES/ CROMOSOMA	9 – 100 pb
MICROSATÉLITES	$10 - 10^2$	$>10^5$ / GENOMA	1 – 6 pb

➤ **2.5.3.1. Secuencias repetidas en tándem de tipo I.** En función del tamaño de la secuencia base se distinguen tres grupos:



2.5.3.1.1. Familias Satélite: El término “ADN satélite” se ha utilizado para describir grandes bloques de ADN altamente repetitivo organizadas en tándem. Hay cuatro grandes clases de satélites: I, II, III y IV. Constituyen un 2 – 6% del genoma. Las secuencias base oscilan entre los 5 pb (satélite III) y los 170 pb (satélite I). La localización de estas secuencias es básicamente la *heterocromatina* estructural de las *regiones centroméricas*.⁴

- **2.5.3.1.2. Satélite Alfoide:** tiene una densidad similar a la de los satélites I y II, sin embargo su secuencia base es de 340 pb.⁴

- **2.5.3.1.3. Midisatélites:** son secuencias repetidas en tándem con una longitud total comprendida entre 250 y 500 kb. Son de copia única y altamente polimórficos.⁴

➤ **2.5.3.2. Secuencias repetidas en tándem de tipo II:** repeticiones cortas: se distinguen en dos grupos:

2.5.3.2.1 MINISATÉLITES.-

Son secuencias de ADN constituidas por una secuencia base de 9 a 100 pb repetida en tándem. Suelen encontrarse cerca de los *telómeros*, aunque también se han encontrado intercalados en otras posiciones cromosómicas. En los extremos de los telómeros existe una familia de minisatélites que se ha denominado “ADN telomérico” y que consta de un bloque de 10 a 15 Kb de repeticiones en tándem de una secuencia de 6 nucleótidos. Los hexanucleótidos son añadidos a los extremos de los telómeros por una enzima llamada *telomerasa* y parece que actúan como amortiguadores de la degradación de los extremos de los cromosomas.^{4, 29}

Estas secuencias de ADN son altamente polimórficas o variables entre los distintos individuos, presentando índices de heterocigosidad mayores del 50% e incluso a veces, cercanos al 100%. A dichos polimorfismos se les denomina VNRT (Variable Number of Tandem Repeat).^{4, 29}



2.5.3.2.2. MICROSATÉLITE.-

- Conocidos como **STR (Short Tandem Repeat)**, contiene una secuencia base de 1 a 6 pb repetida en tándem. Al igual que los minisatélites son secuencias altamente polimórficas. Entre las repeticiones de un solo nucleótido, el nucleótido más repetido en esta secuencia son las A y T (0.3% del genoma nuclear), con respecto a dinucleótidos son CA (0.5% del genoma nuclear), CT/AG (0.2%). Los tri y tetra nucleótidos son raramente localizados pero con alto valor polimórfico utilizados como marcadores genéticos.^{4, 29}

Pueden encontrarse una secuencia de este tipo cada 6 – 10 Kb del genoma humano. En cuanto a los loci tri y tetraméricos, se estima que se distribuyen cada 15 Kb.^{4, 29}

Los STRs se distribuyen ampliamente por todo el genoma encontrándose tanto en regiones génica como en regiones extragénicas o no codificantes son los responsables del gran avance de la Genética Forense.^{4, 29}

El polimorfismo de los loci STRs radica, en las variaciones del número de las repeticiones de la secuencia central, pudiendo variar en la longitud de la unidad de repetición y en el rigor con el que llegan a formar un modelo de repeticiones. Las unidades de repetición “simples” contienen unidades de repetición de idéntica longitud y secuencia, mientras que las unidades llamadas “complejas” pueden contener bloques de repetición de unidades de longitud variable y además una mayor o menor variación de las secuencias. En base a esta explicación se describen dos tipos de STRs:⁴

- Los que poseen un número bajo de alelos (<12) pero bien diferenciados.
- Los que poseen un número elevado de alelos (>35) poco diferenciados.

Los STR más utilizados son los tri, tetra y pentanucleótidos, ya que los dinucleótidos presentarán picos *stutter* como consecuencia de la amplificación.⁴



2.5.3.3. VENTAJAS

- La aplicación de la técnica de PCR, permite obtener varios millones de copias de un fragmento determinado de ADN en un tiempo de 2 o 3 horas, permitiendo analizar muestras cuya cantidad de ADN es escasa. ⁴
- El tamaño de los productos amplificados es pequeño (100 – 500 pb) de forma que es posible obtener resultados a partir de ADN sumamente degradado cuyos fragmentos son de aproximadamente 1000 pb. ⁴
- El tiempo necesario para completar los análisis es muy corto.
- Los sistemas STRs revelan alelos definidos con precisión, es decir, son variables discretas, esto permite simplificar el análisis estadístico de las *frecuencias alélicas* en las poblaciones, y por otro lado es mucho más fácil la estandarización y la comparación de resultados entre diferentes laboratorios. ⁴

2.5.4. SECUENCIAS REPETIDAS INTERCALADAS.

El segundo tipo principal de ADN repetitivo, se encuentra en el genoma humano en una proporción del 20%, está formado por secuencias de repeticiones intercaladas individualmente en forma de unidades sencillas en diversos puntos del genoma. ⁴

2.6. ADN COMO MATERIAL BIOLÓGICO EN LA JUSTICIA. ⁷

- Pruebas de paternidad
- Delitos contra la libertad sexual
- Identificación de cadáveres
- Desastres naturales
- Delitos contra la libertad



La determinación de polimorfismos de ADN, en especial mediante la técnica de PCR, es un procedimiento óptimo cuando necesitamos analizar vestigios mínimos o degradados u otras muestras (esperma, saliva, pelos o cabellos sin bulbo, fragmentos óseos, etc.) en las que las técnicas convencionales proporcionan resultados poco satisfactorios.^{4, 29}

Los polimorfismos de ADN aportan al análisis criminalístico, la posibilidad de identificar y diferenciar fácilmente muestras compuestas por mezclas de fluidos procedentes de diferentes individuos.^{4, 29}

2.6.1. CARACTERÍSTICAS.-⁴

- Único en cada persona.
- El ADN es común a todas las células del cuerpo.
- Posibilidad de identificar una persona a partir de indicios biológicos muy pequeños, invisibles al ojo humano (trazas).
- Es posible obtener información de indicios biológicos aunque haya pasado mucho tiempo desde el momento en que fueron depositados, incluso muchos años después.

2.6.2. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL ADN REPETITIVO.^{4, 29}

Se han descrito varias funciones:

- Puntos calientes para la recombinación homóloga
- Regulación de la transcripción
- Dirección del posicionamiento de las *cromátidas* homólogas durante la meiosis
- Desarrollo de superestructuras locus específicas responsables del plegamiento de la cromatina.
- Síntesis proteica.



2.6.3. EL ADN COMO HERRAMIENTA CIENTÍFICA

En la investigación de un hecho criminal la prueba del ADN consiste básicamente en la comparación del perfil genético obtenido a partir de la evidencia con el perfil genético del sospechoso.⁴

Las áreas donde interviene el estudio y análisis del ADN como indicio en investigaciones con carácter judicial son: la criminalística, las pruebas de paternidad, **la identificación de personas desaparecidas (privación de la libertad)**, la identificación de individuos en desastres, la combinación de todas las mencionadas y en hechos históricos. Su gran utilidad radica en gran parte debido a que sólo se requieren trazas de material biológico, el ADN es más estable en comparación con otros marcadores biológicos tradicionales destacando su precisión en los resultados obtenidos. Esta reciente herramienta, que sienta sus bases en la genética clásica, la bioquímica, la estadística y la biología molecular; “comparece ante la justicia como testigo que no miente y jamás se desdice”.⁶

2.6.4. MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERÉS FORENSE.-

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: sangre, saliva, semen, pelos con raíz, huesos, tejidos, etc., así como de cualquier vestigio que pueda contener algún resto biológico (colillas, chicle, cepillo dental, ropa usada, etc.)^{5, 29}

La selección de las muestras a analizar, su toma y recogida, identificación, conservación, custodia y transporte hasta el laboratorio son factores de vital trascendencia en cualquier análisis de ADN (ver criminalística más arriba).^{5, 30}

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 el estudio de STRs.^{5, 30}



2.6.4.1. RFLPs

Descubiertos por Jeffreys, donde localiza regiones minisatélites hipervariables dispersas por el genoma humano que al ser tratados con enzimas de restricción generaban fragmentos de longitud variable, donde dicha variación en la longitud era debió a que estas regiones consistían en un determinado número de repeticiones en tándem de una secuencia central, la cual varía entre individuos.⁴

Tras el descubrimiento de los RFLP y su aplicación a los casos judiciales, se fueron sustituyendo los marcadores clásicos como los estudios de antígenos eritrocitarios (sistema ABO, Rh, MN), proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y sistema HLA.⁴

2.6.4.2. Análisis de VNTR mediante el estudio de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Dicho estudio se basa en la utilización de las llamadas *enzimas de restricción o restrictasas* que funcionan a modo de “tijeras moleculares” y cortan las cadenas de ADN de forma específica en determinadas secuencias que ha 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.⁵

2.6.4.3. 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 minisatélites 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.⁵



Actualmente existen miles de STRs identificados y se calcula que en el genoma humano existe un STR cada 10 000 pb. 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 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. ⁵

2.6.4.4. STRs en la Criminalística.-

Frecuentemente los indicios biológicos de interés en criminalística se encuentran en cantidades muy pequeñas, en otros casos, están sometidos a condiciones extremas de calor y humedad, afectando considerablemente la cantidad y calidad del ADN. ^{4,}
31

Desde el descubrimiento de la PCR y con la aplicación del análisis de marcadores STRs, las posibilidades de obtener resultados en muestras biológicas mínimas y/o degradadas son mayores. ⁴

Factores de los que depende el análisis y resultados: ⁴

- Cantidad de ADN.- esto dependerá del número de células nucleadas que contenga el vestigio biológico.
- Calidad del ADN.- cuando el ADN está muy degradado o contaminado puede llegar a no ser útil para el estudio de identificación o presentar dificultades para la obtención de resultados.
- Las técnicas utilizadas.- en la mayoría de los casos forenses, los vestigios forenses son escasos y se encuentran degradados, por lo que es importante disponer de la mejor y más moderna tecnología. Los sistemas actuales de amplificación y posterior detección en equipos de electroforesis capilar, permiten la obtención de resultados a partir de cantidades mínimas de ADN (0.5 a 1 ng).



2.5. CRITERIOS A SEGUIR PARA LA SELECCIÓN DE STRs CON APLICACIÓN EN IDENTIFICACIÓN HUMANA. ^{4, 5}

- Alto poder de discriminación
- Alta heterocigosidad
- Localización en distintos cromosomas (para evitar el ligamiento entre marcadores)
- Robustez y reproducibilidad de resultados en reacciones múltiplex
- Baja tasa de mutación
- Longitud de alelos en el rango de 90-450 pb.

Actualmente, los marcadores más extendidos en el ámbito internacional son los 13 STRs autosómicos integrados en el sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) establecido en 1997 por el FBI para la creación de una base de datos de perfiles genéticos. La probabilidad de coincidencia al azar entre individuos no relacionados mediante análisis de los 13 CODIS es inferior a uno en un billón. ^{5, 32}

2.6. OTROS MARCADORES DE ADN CON INTERÉS FORENSE

2.6.1 Marcador de sexo: Amelogenina

Es un locus localizado en una región homóloga de los cromosomas sexuales. Existe una diferencia de seis pares de bases entre el tamaño del *halo* 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 (106 pb, 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 pb, comúnmente). ^{5, 33}



Hay que tener en cuenta que, aunque ocurre con muy baja frecuencia, se ha detectado la existencia de deleciones en esta región del cromosoma Y, de tal forma que una muestra masculina podría asignarse erróneamente como femenina. En este caso, el análisis de marcadores específicos del cromosoma Y permitirían una correcta asignación del sexo.^{5, 33}

2.6.2. STRs del cromosoma Y

El cromosoma Y presenta una diferencia importante respecto al resto de cromosomas, su herencia es exclusivamente paterna, 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.^{5, 33}

En genética forense, resulta de especial utilidad en los casos de agresión sexual.

La limitación de este tipo de análisis reside en que, dado que el cromosoma Y no está sujeto a recombinación, es menos variable entre individuos, por lo que es necesario el análisis de muchos marcadores para obtener un alto grado de discriminación.⁵

2.6.3. ADN mitocondrial

En las mitocondrias se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt). Se trata de una molécula circular de 16 569 pares de bases, en la que se localiza 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 nuevas secuencias obtenidas.^{5, 34}

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 es circular y a su localización en el interior de las mitocondrias (factores que la hacen más resistentes 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 de ADN nuclear, como los huesos, dientes y pelos.^{5, 34}

Este ADN es de herencia exclusivamente materna, se transmite de la madre a toda su descendencia ya que únicamente el óvulo aporta las mitocondrias al cigoto. Al igual que 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. Es por ello, que el análisis de ADNmt es de utilidad en casos de filiación y en estudios de evolución para trazar linajes maternos.^{5, 34}

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 conocido 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.^{4, 5, 34}

2.6.4. Polimorfismo 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 pb y en la actualidad se han descrito más de dos millones.^{5, 29}

Utilidad y ventajas en la Genética Forense:^{5, 29}

- a) No presentan el fenómeno de “Stutter”, por lo que permitirían discriminar más fácilmente si una muestra es de origen único o es una mezcla
- b) Presenta un mayor potencial que los STRs para el desarrollo del sistemas múltiplex
- c) El proceso 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 pb, 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, determinados por la presencia de una base u otra en esa posición, por lo que, 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 las de la batería de los 13 STRs del CODIS.^{5, 29}

2.7. MARCADORES GENÉTICOS DE INTERES FORENSE.-

Todos los individuos de la especie humana son idénticos entre sí en un 99,98% de su ADN y sólo 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 los 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 señalar que, como se dijo anteriormente, la variabilidad genética entre individuos se concentra principalmente en el ADN no codificante, por lo que, 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.)^{5, 30, 32}

Existen dos tipos de *polimorfismos*:

a) *De secuencia*.- se le denomina así, por el hecho de que los alelos de un mismo locus se diferencia en la base (A, C, G o T) presente en una o más posiciones concretas. Suelen ser poco polimórficos y son típicos del ADN expresivo.^{4, 5}

b) *De longitud*.- los alelos de un locus se diferencia entre ellos por el número total de bases que lo componen, siendo muy común en las secuencias repetidas en tándem, en las que el número total de unidades de repetición definen a cada alelo. Se producen por la inserción o delección.^{4, 5}

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 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.^{5, 30}

2.8. SISTEMA POWER PLEX 16 HS, POWER PLEX 17 ESX y POWER PLEX FUSION SYSTEM

Los *loci* presentes en forma de repeticiones cortas en tándem (STR) son comúnmente los marcadores usados en la identificación humana por su alto nivel de polimorfismo, la habilidad para tipificar más de 15 loci en una sola corrida es la característica relevante de aumentar el poder de discriminación, reducción en el consumo de muestra y la habilidad para tipificar (cuantificar) muestras degradadas.^{6,}
29

Existe una variabilidad en los sistemas de amplificación que permiten el análisis del ADN humano para propósitos de investigación disponible en el mercado. Power Plex 16 HS y Power Plex 17 ESX (Promega, Madison, WI, USA), son dos sistemas direccionados al campo de la ciencia forense. El primero contiene una solución buffer renovada tolerante para los inhibidores más frecuentes, mientras que el segundo tiene un juego de *primers* que permite la simultánea amplificación de miniSTR's, midiSTR's que son los STR's actualmente utilizados para dichos fines. Haciendo posible la amplificación de ADN humano altamente degradado.^{32, 35}

Actualmente *Promega Corporation*, comercializadora implicada en la identificación humana, fabrica hoy en día kits para la amplificación conjunta de 24 locus para aplicaciones de identificación humana, incluido el análisis forense y pruebas de relación. Este sistema de cinco colores permite coamplificación y detección de los 13 STRs del CODIS (EE.UU) loci CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 and D21S11), los 12 loci del European Standard (TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179, D18S51, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 and D12S391) más la Amelogenina para la determinación del sexo, además se incluye el locus DYS391 STR de confirmación en cromosoma Y; pudiendo en una única reacción obtener un perfil genético bastante completo de una muestra.^{5, 35}

2.9. VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE ADN

En la mayoría de los casos de identificación forense, la prueba de ADN tiene valor científico y por consiguiente las disposiciones que le sean adscritas, si es posible una **comparación** de perfiles de un vestigio frente a una muestra o indicio o entre diferentes vestigios. Cuando se trata de investigar si un resto biológico puede pertenecer a un determinado individuo, es necesario realizar un cotejo de los perfiles genéticos obtenidos. Si los perfiles son distintos, puede asegurarse que ese resto biológico no pertenece al individuo en cuestión o que ambos vestigios proceden de personas diferentes. Pero si existe una coincidencia entre los perfiles comparados es necesario realizar una valoración estadística para estimar el grado de incertidumbre de que esos perfiles coincidan entre sí sólo por cuestiones de azar y no porque procedan del mismo individuo.⁵

2.10. ESTANDARIZACIÓN EN GENÉTICA FORENSE

Se ha realizado la estandarización no sólo de las técnicas de análisis sino también de los marcadores a utilizar, su nomenclatura y la valoración estadística de los resultados. Organizaciones como la TWGDAM (*Technical Working Group on DNA Analysis and Methods*) en E.U., la EDNAP (*European DNA Profiling group*) y la ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) en Europa, así como las actividades de los distintos grupos de trabajo de ISFG (*International Society for Forensic Genetics*) entre las que destaca la realización de ejercicios colaborativos con numerosos laboratorios participantes (participan más de 100 laboratorios de España, Portugal y Sudamérica) han colaborado para obtener la estandarización deseada, así, viéndose reflejado hoy en día en el reconocimiento internacional de la Genética Forense como una de las disciplinas científicas con niveles más altos de estandarización en las técnicas utilizadas y criterios de análisis.⁵



2.11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho evento.^{5, 46}

Rápida, relativamente económica y simple de reproducir, útil debido a las cantidades muy pequeñas de moléculas de material de ADN, incluso si la fuente es de pobre calidad.^{5, 36}

El estudio de indicios biológicos por PCR ha permitido la resolución de un gran número de casos en criminalística que hasta entonces eran desestimados por no poseer la suficiente cantidad de muestras para su análisis por RFLP. Con el uso de la PCR muestras tan mínimas como pueden ser pelo con raíz, una minúscula mancha de sangre, semen e incluso caspa son suficientes para llevar a cabo un análisis de identificación genética.^{26, 32}

La PCR permite la obtención *in vitro* de millones de copias de un fragmento de ADN específico a partir de una cantidad ínfima de ADN (hasta de picogramos) mediante una reacción enzimática cíclica.^{5, 38}

El pequeño tamaño de las unidades amplificadas sugiere que pueden estudiarse simultáneamente varios loci mediante amplificación PCR multiplex y análisis con identificación precisa de los alelos en geles de secuenciación de ADN. La precisión, sensibilidad y rapidez de detección de los alelos mediante PCR ofrece la oportunidad de su investigación en especímenes forenses. La fidelidad de amplificación de los STRs triméricos y tetraméricos indica que el tipaje genético puede ser fácilmente interpretado y susceptible de automatización, por lo tanto, la combinación de multiplex PCR-STR y la detección fluorescente automatizada resultan en una técnica rápida y poderosa para la obtención de perfiles de ADN.^{5, 29}

El uso de tecnología automatizada basada en fluorescencia para la detección de STRs incorpora la medición de tamaños de los productos de PCR y elimina las diferencias en la movilidad electroforética entre las canales del gel, ya que incorpora marcadores de tamaño internos con cada muestra.^{4, 29}



2.11.1. COMPONENTES DE LA PCR.-

Los componentes básicos en una mezcla de reacción son: ^{4, 32, 36}

- ADN molde (ADN Template), extraído a partir de la muestra objeto de análisis.
- Dos oligonucleótidos o “cebadores” o “primers” (pequeños fragmentos de ADN de cadena simple de secuencia complementaria a las regiones que flanquean al segmento de ADN de interés) que mediante su unión específica al ADN molde permiten iniciar la reacción.

Características que deben reunir:

- La longitud de cada uno de los primers debe estar comprendida entre 18 y 24 bases.
- Ambos primers deben tener una T_m similar.
- La relación bases púricas – bases pirimídicas debe ser 1:1 (máximo 40 – 60%).
- La secuencia de los primers debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.
- Taq Polimerasa. Enzima que cataliza la reacción. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 – 85°C). A esta temperatura la enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo.

La actividad de la Taq es sensible a la concentración del ión Mg^{2+} , así como a la concentración y naturaleza de los iones monovalentes.

- Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTPs). Sirven de sustratos con los que se sintetizan las nuevas cadenas de ADN.



La concentración de dNTPs debe estar relacionada con la de cloruro de magnesio, ya que el magnesio se une a los dNTPs y por lo tanto la cantidad de dNTPs presentes en la muestra determinará la cantidad de magnesio libre disponible, es decir, si se produce una disminución significativa en la concentración de nucleótidos, debemos de realizar una corrección de la cantidad de Cloruro de Magnesio a aportar a la reacción.

- Buffer de Reacción. Tampón y sales complementarias para el óptimo funcionamiento de la enzima. ($MgCl_2$)
- Adyuvantes. El adyuvante más utilizado es el BSA, incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq Polimerasa.

Aparte de las muestras que van a ser amplificadas, es muy importante incluir controles tanto positivos como negativos:

- Control negativo. Lleva todos los componentes de la PCR excepto el ADN; por lo tanto no se debe obtener ningún resultado de amplificación, en caso contrario significaría que alguno de los componentes puede estar contaminado con ADN.
- Control positivo. Es una muestra de ADN cuya concentración es conocida, además del resultado que debe salir, por lo que indica si la amplificación fue satisfactoria o no.

2.11.2. DETALLES EN EL PROCESO DE LA PCR.

- Con respecto al Buffer de Reacción, algunos protocolos incluyen un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), el cual reduce la estructura secundaria del ADN que se va a amplificar, donde se ha comprobado que el DMSO puede inhibir ligeramente la Taq Polimerasa y disminuir el rendimiento general de la reacción.^{4, 32}
- Dímeros de primers. Son fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los primers y parece que se produce cuando un primer es extendido a continuación del otro. El resultado es un patrón extraordinariamente eficiente para la PCR.^{4, 32}



2.11.3. PROCESO ESTÁNDAR DE PCR.- implica la repetición de un número determinado de ciclos, cada uno de los cuales consta de tres pasos:

a) **Desnaturalización.-** mediante la elevación de la temperatura a 94-85°C las dos cadenas de la doble hélice de ADN molde se separan, por medio de la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios, quedando en forma de cadena simple.
4, 5

b) **Hibridación (anealing o emparejamiento).-** al disminuir la temperatura a 50-60°C, los cebadores se unen al ADN molde justo en el lugar de sus secuencias complementarias (su pequeño tamaño favorece esta unión frente a la posibilidad de renaturalización o unión de la cadena complementaria de ADN molde).^{4, 5}

c) **Extensión.-** el calentamiento a 72°C (temperatura óptima de funcionamiento de la polimerasa), permite la extensión de la cadena de ADN a partir de los cebadores mediante la adición sucesiva de nucleótidos tomando como referencia la secuencia del ADN molde.^{4, 5}

Estos tres pasos se repiten cíclicamente entre 25 y 35 veces, de forma que el proceso total de la reacción dura aproximadamente 3 horas. En cada ciclo se produce un incremento exponencial en el número de copias, de forma que el resultado de la reacción de PCR es la obtención de una solución con millones de copias del segmento de ADN interesado.⁵

Fase de Meseta o Plateau: no se trata de un ciclo más de la reacción, aunque es algo común a todas ellas si se dejan desarrollar durante un número de ciclos suficiente, por lo que se puede considerar como un final común a todas las PCR que pueden llegar a “adelantarse” y ser motivo de artefactos y errores de la Reacción.⁵

En algunas circunstancias no limitadas por la existencia de unas determinadas condiciones químicas la reacción tendería a ser infinita, en la práctica no lo es, tras un número determinado de ciclos la amplificación del fragmento diana que ha venido llevando un crecimiento exponencial, comienza gradualmente a detenerse, acumulándose y entrando en una fase estacionaria o de meseta, también conocida como plateau.^{4, 5}



2.11.4. TERMOCICLADORES

La PCR se lleva a cabo en un termociclador, aparato que permite un rápido y preciso calentamiento y enfriamiento de las muestras y que admite variaciones de los programas de reacción para su ajuste de análisis interesado. ⁵

2.11.5. USOS Y APLICACIONES DE LA PCR

Este método se utiliza principalmente para el análisis de marcadores STRs (también VNTRs), que se basa en la determinación de tamaño en pares de bases de los fragmentos de ADN generados en la PCR, tamaño que vendrá definido por el número de repeticiones presentes en cada alelo. La separación de los fragmentos se lleva a cabo mediante electroforesis capilar, y para la estimación del tamaño se usa un estándar interno de tamaño (Ladder) de cada muestra. Además, se requieren patrones alélicos de cada marcador que sirvan de referencia para la asignación de los alelos presentes en la muestra problema. ⁵

Para el análisis conjunto de varios marcadores genéticos mediante PCR ha sido necesario el establecimiento de reacciones de PCR multiplex que permiten amplificar simultáneamente varias regiones de ADN distintas, mediante la adición a la mezcla de reacción de más de un par de cebadores. Ello ha supuesto un gran esfuerzo conjunto por parte de la comunidad científica genético-forense y de las casas comerciales para el desarrollo, puesta a punto y validación de kits de reacción de PCR optimizados para obtener el máximo rendimiento de la mínima cantidad de ADN, lo que se ha traducido en una disminución importante en la cantidad de ADN molde requerida, factor importante en muestras mínimas. ⁵

Los avances científicos y tecnológicos incluyen el desarrollo de múltiples fluorocromos para el marcaje diferencial de fragmentos de ADN y plataformas complejas de detección, capaces de discriminar selectivamente entre ellos, hoy en día se pueden analizar de forma conjunta hasta 21 marcadores STRs a partir de tan sólo 0.1-1 ng de ADN, obteniéndose un perfil genético suficientes para la individualización de un resto biológico. De esta forma, tras una reacción de PCR se puede obtener un buen resultado a partir de un vestigio que contenga tan sólo unas 100 células. ⁵



2.11.6. VENTAJAS

Permite amplificar conjuntamente más de un marcador en una sola reacción, conocida como Múltiplex PCR.⁴

En este tipo de PCR se añaden en un mismo tubo de amplificación los primers necesarios para amplificar 3, 4, y 9 e incluso hasta 16 marcadores distintos. Para ello es necesario optimizar muy bien las condiciones de amplificación y obtener aquellas en las que todos los primers funcionen perfectamente.^{5, 32}

- Rapidez y sencillez. Permite obtener copias de ADN en pocas horas.⁴
- Elevada sensibilidad. Capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es mínima, actualmente es posible amplificar a partir de cantidades de 1ng.⁴
- Capacidad para obtener resultados en casos en los que el ADN esté parcialmente degradado. En el caso de indicios biológicos en los que el ADN está parcialmente degradado, es probable que muchos de los STRs, al ser de pequeño tamaño, no se hayan perjudicado en todas las moléculas de ADN, por lo que puede obtenerse un resultado de amplificación positivo.⁴
- Permite la determinación y agrupación alélica en clases discretas, lo que facilita la elaboración de bases de datos.⁴

2.11.7. RIESGOS Y LIMITACIONES DE LA PCR

- **Alto 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 lugar de los hechos o lugar del hallazgo) 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.⁵



- **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. ^{5, 32}
- **Inhibición.**- de la reacción de la 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. ⁵
- **Modificación del ADN.**- consisten en la existencia de enlaces covalentes intra o intercatenarios, depurinización o roturas que hacen al ADN susceptible de ser amplificado y que pueden deberse al estado de conservación de la muestra (tejidos en formol) u otros factores (luz ultravioleta). ⁵
- **Exceso de sustrato.**- en este caso hay más ADN que Taq capaz de replicarlo en el tiempo de extensión asignado. Esta situación puede solucionarse aumentando el tiempo de extensión y/o aumentando la cantidad de enzima.

En ocasiones se puede coamplificar un ADN extraño o ajeno al de interés aunque esté en pequeña cantidad. ^{5, 32}

2.11.8. ARTEFACTOS

Durante la amplificación por PCR de marcadores STRs pueden originarse una serie de artefactos que pueden interferir con una clara interpretación y cuya consideración es necesaria para garantizar un correcto genotipado. ^{5, 29}

- **Bandas “stutter”.**- 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 favorecido 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 la 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. ^{5, 29}



- Detección de alelos no presentes en el patrón alélico y la no amplificación o pérdida de algún alelo (alelo nulo).^{5, 29}

Estos fenómenos se dan, ya sea por amplificación preferencial o bien por la existencia de una mutación en la zona de apareamiento de cebador, a la detección de más de dos alelos para un marcador que puede deberse a una duplicación o translocación de la región analizada o también a una mutación parcial en la zona de apareamiento del cebador.^{5, 29}

Por otra parte con cierta frecuencia se presentan 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 la que participa cada perfil puede ser muy desigual, por lo que podría ocurrir que para algunos marcadores haya alelos que no se detecten. Asimismo, algunos resultados artefactuales que en ausencia de mezcla pueden discriminarse fácilmente respecto a los alelos, en el caso de las mezclas podrían asignarse como picos alélicos sin que en realidad formen parte de ningún perfil genético. Por ello, en análisis de estos resultados es más complicado que en casos de perfiles únicos.^{5, 29}

2.12. PCR EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (RT-PCR)

Permite visualizar y cuantificar los productos de amplificación a medida que transcurren los ciclos de la PCR (de ahí el nombre de tiempo real).^{4, 40}

The Plexor[®] HY System (Promega)

Es un nuevo método de PCR en tiempo real que tiene la ventaja la interacción específica entre dos nucleótidos modificados para lograr el análisis cuantitativo. Dos bases modificadas, isoguanina (iso-dG) y la 5'-metilisocitosina (iso-dC), forman un único par de bases en la doble hebra de ADN (Figura 2). Para realizar la PCR fluorescente cuantitativa usando esta técnica, uno de los oligos es sintetizado con un residuo iso-dC como nucleótido 5'-terminal y una etiqueta fluorescente en la posición 5'-final; el segundo primer no es etiquetado. Durante la PCR, el primer etiquetado se alinea y se extiende, volviéndose parte de la plantilla que se usará durante las siguientes rondas de amplificación. Durante las subsecuentes rondas de amplificación, el complementario iso-dGTP, el cual está disponible en la mezcla de nucleótidos como dabcil-iso-dGTP, se aparea específicamente con el iso-dC. Cuando el dabcil (quencher o apagador) es incorporado a la nueva hebra de ADN, su proximidad con el marcador fluorescente que se encuentra sobre la hebra opuesta hace que se apague la señal.^{29, 40}



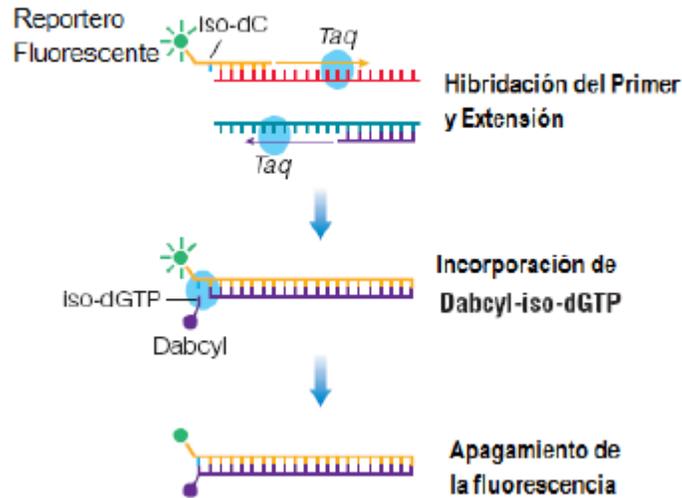


Fig. 8 PCR cuantitativa Plexor real-time (Modificado de www.promege.com/tbs/) Citado Oct. 2013

Para el acoplamiento directo de la detección de la fluorescencia y los ciclos térmicos, lo que se mide en PCR en tiempo real en cada ciclo, son los cambios en la señal de la fluorescencia en unidades relativas o RFU (por sus siglas en inglés). El nivel de fluorescencia en las reacciones iniciales de los oligos etiquetados es alto en el Sistema Plexor[®]. Con los productos acumulados de la amplificación, la señal decrece. Los datos de amplificación presentan una curva característica tri-fase.^{29, 40}

La parte de la curva con el cambio de señal más alto, es la fase exponencial, que es la fase más consistente y es usada para estimar la cantidad de material inicial. Un umbral de amplificación, es el conjunto dentro de la fase exponencial, con el nivel de fluorescencia en el que todas las curvas de amplificación, exhiben en su mayoría una señal significativa decreciente. El punto en el cual una curva de amplificación cruza este umbral, se le llama “umbral del ciclo de la muestra” (C_t), cuyos valores para una serie de diluciones de una muestra con una cantidad de ADN conocido son usados para generar una curva estándar, que se utiliza para cuantificar muestras con cantidades desconocidas de ADN.^{29, 40}

El apagado del marcador fluorescente por el dabcil es un proceso reversible. La fluorescencia es apagada cuando el producto está en doble hebra, debido a la gran proximidad entre el dabcil y el marcador fluorescente. La desnaturalización del producto separa el marcador y al dabcil, que resulta en un incremento en la señal de la fluorescencia.

Consecuentemente, las curvas de la temperatura de fusión pueden ser generadas, al permitir que todo el producto que está en forma de ADN de doble hebra baje la temperatura (60°C) y lentamente se eleve para desnaturalizarla (95°C).^{29, 40}

La curva de fusión se determina trazando los cambios de fluorescencia con relación a la variación de temperatura, calculando el cambio más grande en la fluorescencia con la derivada ($dRFU/dT$) de la temperatura de fusión (T_m). La longitud del producto y la secuencia tiene impacto sobre T_m , así la curva de fusión es usada para caracterizar la homogeneidad de los productos de PCR. La amplificación no específica, puede ser identificada por la presencia de picos amplios en la curva de fusión o por picos con diferente valor de T_m . Para distinguir productos de amplificación específicos y no específicos, la curva de fusión añade una característica al control de calidad durante la rutina del uso de ensayos de validación o pre diseño.^{29, 40}

Un beneficio de la tecnología Plexor[®] sobre la detección usando ADN de una sola hebra unida a un colorante, es la capacidad de amplificar diferentes regiones al mismo tiempo, con la ventaja de poder diferenciar cada una, gracias al uso de varios colorantes a la vez, conocido como *multiplexing*. El oligo etiquetado puede lograrse con alguno de los marcadores fluorescentes más comúnmente usados en la PCR fluorescente, esto permite usar de dos a cinco colores (*multiplexing*), que depende del instrumento que se utilice. La simplicidad del *primer* diseñado por la tecnología del Plexor[®], es una ventaja distinta sobre la propuesta de PCR cuantitativa basada en sondas que son hidrolizadas durante el proceso de amplificación.^{29, 40}

La Fluoresceína del Sistema Plexor HY[®], se usa para detectar el blanco de ADN humano autosomal. Los oligos amplifican regiones multicopia del tamaño de 99pb ubicados sobre el cromosoma 17. Los datos de esta reacción son usados para cuantificar la cantidad de ADN total en una muestra.^{29, 40}

El fluoroforo CAL Fluor[®] Orange 560 del sistema Plexor HY[®], es usado para detectar el ADN blanco en el cromosoma Y. Los oligos amplifican en regiones multicopia del tamaño de 133pb sobre el cromosoma Y. Los datos de esta reacción son usados para cuantificar la cantidad de ADN total de una muestra.⁴⁰

El fluoroforo CAL Fluor[®] Red 610 del sistema Plexor HY[®], es usado para detectar el Control Interno de PCR (IPC), el cual es adicionado en todas las reacciones. El producto de amplificación es de 150pb. Los datos de este blanco son usadas para monitorear la inhibición de las muestras amplificadas.⁴⁰

El fluoroforo IC5 del sistema Plexor HY[®], es usado como una referencia pasiva. El reactivo marcado con el IC5 está adicionado a la mezcla de reacción de todas las muestras. Los datos de los tres canales de amplificación (Fluoresceína, CAL Fluor[®] Orange 560, CAL Fluor[®] Red 610) pueden ser normalizados con esta señal.⁴⁰



El sistema Plexor HY[®] usa una química hot start lo que significa que la polimerasa, para ser activada, debe ser previamente calentada a 95°C durante 2 minutos. Las mezclas de reacciones pueden ser realizadas a temperatura ambiente y se pueden adaptar para la automatización.⁴⁰

TIPAJE DE LOS STRs

2.13. ELECTROFORESIS CAPILAR (CE).

Una vez que los STRs han sido amplificados se procese al tipaje o asignación de alelos por el método de **Electroforesis capilar** y una subsecuente asignación de alelos automatizados a través de un software.^{4, 29, 41}

Fundamento.

Es un proceso físico mediante el cual partículas cargadas migran a través de un determinado soporte cuando son sometidas a la fuerza de un campo eléctrico. El ADN, debido a los grupos fosfato, tiene carga negativa, por lo que, dentro de un campo eléctrico, tenderá a moverse hacia el polo positivo o ánodo. Todos los fragmentos de ADN migrarán hacia el ánodo, pero los fragmentos más pequeños lo harán de manera más rápida que los de mayor tamaño.^{4, 29, 41}

Los productos de amplificación pueden ser separados en función de su tamaño mediante electroforesis capilar y detección por fluorescencia.⁴

Es un método para la separación de fragmentos y obtención de secuencias de ADN que suple los inconvenientes de los métodos convencionales.⁴

El soporte o medio de separación es un polímero incluido en un capilar de sílica de unos 50µm de diámetro y de longitud variable lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores.^{4, 29}



La gran ventaja en cuanto a rapidez de la técnica se debe a que la preparación del gel y la carga de muestras se hacen de manera automática. Por otro lado se consigue una mayor sensibilidad al obtener resultados interpretables en los casos en los que el número de copias obtenidas por PCR es bastante bajo y aumenta la capacidad para diferenciar alelos que se distinguen en un par de bases.^{4, 41}

Los resultados obtenidos son analizados por un software evitándose así problemas de interpretación y permitiendo que éstos queden almacenados para su análisis posterior.^{4, 41}

Para que pueda llevarse a cabo el análisis por electroforesis capilar es necesario que el ADN sea amplificado utilizando un par de primers o más (múltiplex) marcados en el extremo 5' con unas moléculas llamadas *fluorocromos* los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda cuando son excitados por láser. En los kits de amplificación los fluorocromos van ligados a uno de los primers, mientras que en kits de secuenciación pueden ir marcados o bien los primers o bien los dideoxínucleótidos.^{4, 29, 41}

El software de recogida de datos define ciertas áreas en una cámara especial para recoger exclusivamente las emisiones procedentes del grupo de fluorocromos que se estén utilizando. Estas áreas se conocen con el nombre de *filtros virtuales* y su funcionamiento es separar las diferentes longitudes de onda. A pesar que existe cierto solapamiento entre los diferentes rangos, este problema es minimizado gracias a la creación en el ordenador de una matriz matemática. Dicha matriz consta de cuatro filas y cuatro columnas y los números indican el grado de solapamiento entre las longitudes de onda emitidas por los cuatro fluorocromos.⁴

2.13.1. ANALIZADOR ABI Prism 3100 (utilizado en este proyecto).

Fundamentalmente el analizador genético consta de dos partes:

- Una en la que se lleva a cabo todo el proceso de inyección de polímero hacia el capilar, electroforesis y detección de la fluorescencia.
- Y el sistema informático acoplado al analizador.

Utiliza seis tipos de filtros virtuales denominados A, B, C, D, E, F. los filtros A, C, D y F son usados en aplicaciones de GeneScan que es un software para análisis de fragmentos, mientras que el B y E se usan para aplicaciones de secuenciación. Cada filtro combina cuatro o menos fluorocromos (incluyendo el estándar de tamaño) asignando un color para cada uno de ellos.



Capilar. – en él se lleva a cabo la electroforesis, se encuentra cubierto por poliamida opaca excepto por una pequeña zona denominada “ventana de capilar” la cual es atravesada por el láser y permite que las muestras sean excitadas a su paso por la misma.

Finalmente los datos analizados son enviados a la computadora mediante el software, el cual los transforma en secuencias de ADN o en fragmentos analizados con sus correspondientes alelos asignados.^{4, 29, 41}

En analizador consta de dos partes:^{4, 29 41}

1. Donde se lleva a cabo todo el proceso de inyección de la muestra, electroforesis y detección de la fluorescencia.
2. El sistema informático acoplado al analizador.

PRINCIPALES COMPONENTES.^{4, 41}

- Soporte, con capacidad para 48 o 96 tubos
- Distribuidos de muestras o autosampler
- 2 reservorios de 4mL
- 1 tubo eppendorf
- 1 electrodo negativo
- Capilar
- Fuente de alto voltaje
- 1 jeringa
- Electrodo positivo
- Válvula de buffer del ánodo
- Válvula de desecho
- Plato
- Capilar de sílica
- Láser de argón
- 1 cámara CCD
- 1 ventana detectora
- Ordenador (software)

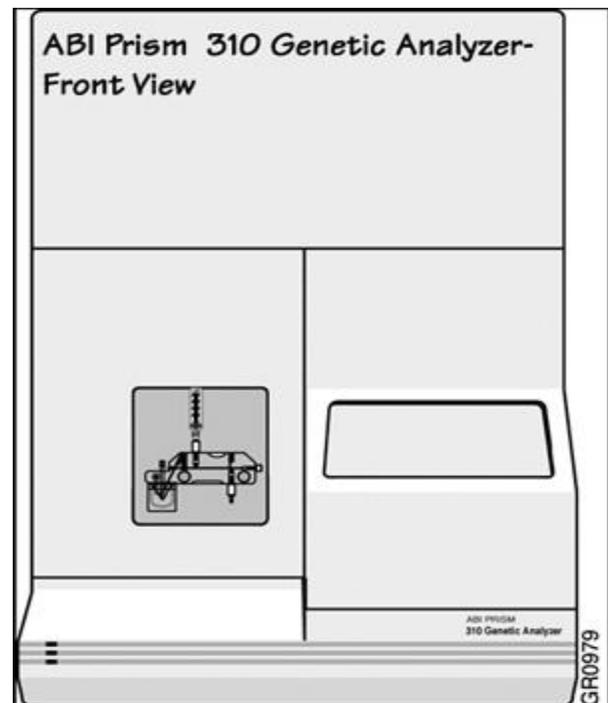


Fig. 9 ABI Prism 310 Genetic Analyzer-Front View. (Modificado de <http://www.nfstc.org>) Citado Enero 2014.



Existen dos programas que analizan el dato bruto y lo convierten en secuencias de ADN o en fragmentos de un determinado tamaño:

- **ABI Prism®DNA 310/3100 Data Collection:** para secuenciación.
- **GeneMapper®Analysis:** para análisis de fragmentos.

2.13.2. VENTAJAS DEL USO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR. 4, 29, 41

- La utilización de diferentes fluorocromos para cada locus permite el análisis simultáneo de varios loci aunque éstos poseen alelos con tamaños solapantes.
- La cuantificación del tamaño en pares de bases del fragmento amplificado se hace de manera exacta, ya que, en cada muestra se incorpora un estándar interno de movilidad que permite medir de manera automática el tamaño.
- Se marca sólo uno de los primers, haciendo posible detectar cantidades muy pequeñas de ADN amplificado.
- Los resultados se obtienen de manera informatizada facilitando su análisis.
- Rapidez de la técnica.

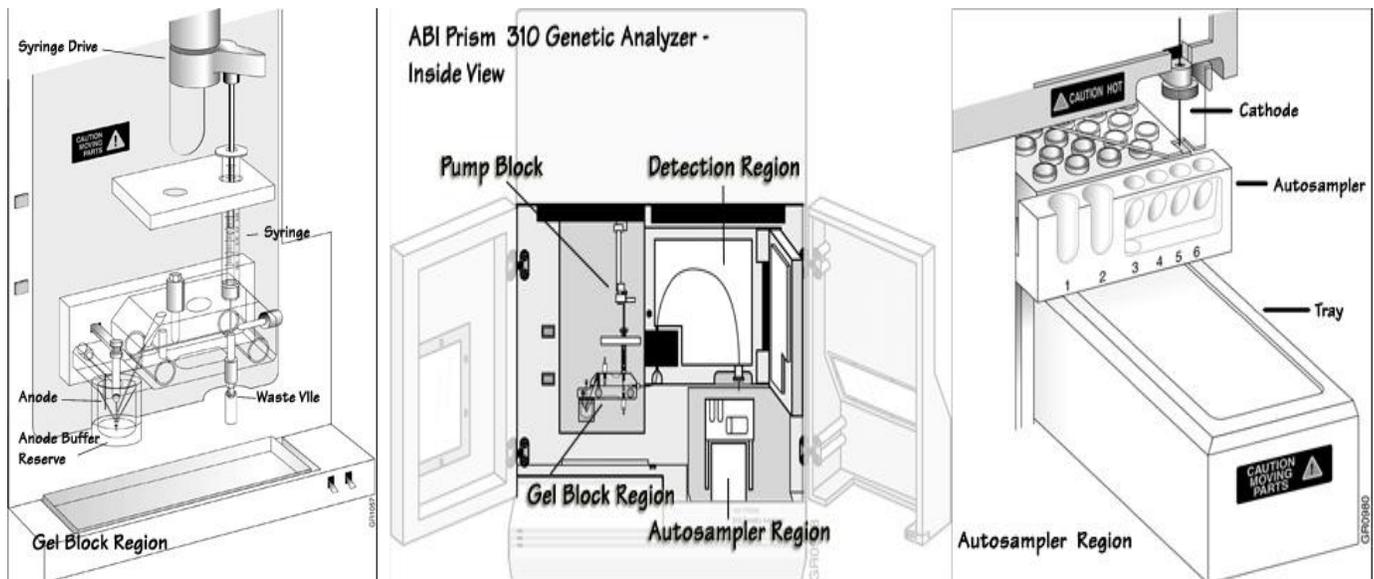


Fig. 9 ABI Prism 310 Genetic Analyzer-Front View. (Modificado de <http://www.nfstc.org>) Citado Enero 2014.

2.14. MOSQUITO

La familia de los mosquitos está conformada por más de 3,000 especies.⁴³

2.14.1. Clasificación Científica: ⁴⁴

Reino:	Animalia
Filo:	arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Díptera
Suborden:	Nematóceras
Inflaorden:	culicomorpha
Familia:	culisidae

La familia Culicidae se subdivide en tres diferentes subfamilias: ⁴⁵

Toxorhynchitinae^a

Anophelinae^b

Culicinae^c

a.- Son mosquitos fitófagos (se alimentan de plantas), por lo que no representan ninguna amenaza médico – veterinaria. ⁴⁶

b.- Son vectores de enfermedades humanas y son objeto de estudio en todo el mundo. ⁴⁶

c.- Culícidos: verdaderos mosquitos, parásitos “hematófagos” ⁴⁶

2.14.2. Anatomía

El mosquito está dotado de un esqueleto dérmico, duro y externo, compuesto, en su mayoría, por quitina córnea, sustancia segregada por el mismo animal, que como una envoltura cubre todo su cuerpo con diferentes grosores. ^{44, 45, 46}

Las partes más esclerosas, auténticas placas duras y resistentes, cubren los puntos vitales y más vulnerables de su organismo, encontrándose separadas entre sí por partes más delgadas, que, a modo de pliegues articulados permiten al insecto su movilidad. Este movimiento se efectúa por medio de los músculos insertados en las partes internas del propio esqueleto dérmico. ^{44, 45, 46}



Las antenas “plumosas” de las hembras mosquito, son los órganos especializados en encontrar el más leve rastro del olor corporal, así como del calor, la humedad y el CO₂ que se emite durante la respiración. ^{44, 45, 46}

Caracteres taxonómicos diferencial entre sexos:

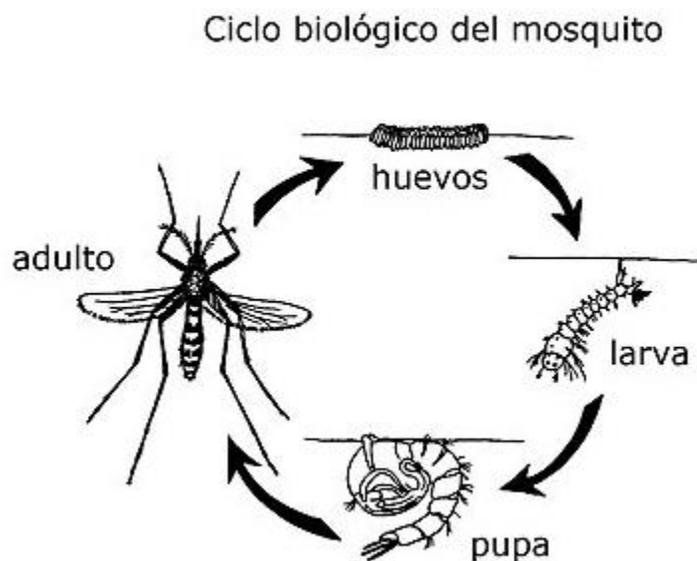
Hembras:

- Son las hematófagas
- Boca extendida (probóscide)
- Segregan anticoagulante

Machos:

*no presentan probóscide

2.14.3. Etapas de desarrollo:



Presentan dos etapas diferenciadas en su ciclo de vida: la fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa), y fase aérea o de adulto.

La fase acuática dura aproximadamente siete días, con rangos entre tres y doce dependiendo de la temperatura.

Los huevecillos soportan la desecación hasta de un año, el periodo de larvas comprende cuatro grados evolutivos denominados: primero, segundo, tercero y cuarto. El tiempo aproximado para pasar de un grado a otro es de aproximadamente 48 horas.

En estado de pupa o pulpa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge del agua, una vez emergido, se alimenta por primera vez entre las 20 y 72 horas posteriores.

Durante dos días, el nuevo mosquito adulto no podrá alimentarse de sangre ni aparearse. Un mosquito común, puede cubrir todo su ciclo de vida en 14 días a 21°C y en sólo 10 días a 27°C.

En los adultos, las hembras son más longevas que los machos. Generalmente, el periodo de vida de las hembras es de aproximadamente 2 semanas a un mes; en algunos casos, tanto en condiciones naturales como de laboratorio, la supervivencia puede ser de varios meses. Una hembra puede depositar entre 100 y 300 huevos luego de ingerir sangre, pudiendo realizar varias ingestas a lo largo de su vida.

Los machos se alimentan de sustancias azucaradas (néctar y exudados de frutos).

2.14.4. Ciclo Gonodotrófico

Se le denomina ciclo gonodotrófico al proceso abarcado desde que el mosquito succiona la sangre – ovopostura – hasta que vuelve a alimentarse.

Consiste en la absorción de sangre, digestión, maduración de los oocitos y la ovoposición.

El tiempo para la digestión de sangre y su consecuente producción de huevos varía de 3 a 5 días dependiendo de la temperatura ambiental.

Después de cada ingesta, el mosquito desarrolla un lote de huevos. Con una sola hidratación los ovarios consiguen su pleno desarrollo, cuando esto no sucede, la hembra necesita una nueva ingesta de sangre, a este proceso se le denomina *desarmonía gonotrófica*.



Mecanismo de Ingesta.

Su alimentación de sangre suele ser nocturna principalmente en mamíferos, ya sean seres humanos o animales. Su proceso consta de cuatro etapas:

- 1) Reconocimiento del huésped.
- 2) Exploración de la zona.
- 3) Succión.
- 4) Retirada de la probóscide.

El mecanismo de succión suele comenzar con la *perforación* de la piel del mamífero, al introducir la probóscide comienza con la succión de la sangre y despide su saliva, ésta cumple con la función anticoagulante que facilita la succión, provocando alguna reacción alérgica que se manifiesta por picazón y roncha. El objetivo principal de alimentarse con sangre es debido a la necesidad de los nutrientes que proporciona la sangre de los mamíferos.

La mancha roja que queda después de la picadura, se debe a una pequeña hemorragia favorecida por la saliva anticoagulante.

2.14.5. Alimentación.-

Se alimentan de gran variedad de nutrientes, de plantas vivas o muertas, carroña, productos animales, vegetales o **sangre**.

La sangre como alimento, si bien es rica en varios factores nutritivos, es pobre en vitaminas, en especial del grupo B, por lo que éstas son obtenidas mediante simbiontes intracelulares, organizados en estructuras llamadas micetomas o, libres en el tracto intestinal.

Los sistemas digestivos varían mucho considerablemente con los diferentes grupos de alimentos utilizados. Las enzimas digestivas están asociadas con su tipo de alimentación, los insectos que se alimentan de sangre, tienen estructuras especiales para extraer gran cantidad de agua del alimento antes de que el alimento se ponga en contacto con las enzimas digestivas.



2.14.6. Algunas ventajas de los insectos con respecto a otros animales de uso forense.

No es sólo su elevado número de especies, sino también otras diversas características las que los colocan en situación ventajosa respecto a otros animales y al hombre; entre ellas citaremos la presencia del esqueleto externo o exoesqueleto, formado por el endurecimiento de las paredes del cuerpo para proteger los órganos internos de la excesiva evaporación, su tamaño generalmente pequeño los hace difícilmente distinguibles de sus enemigos naturales y los defiende de otras circunstancias adversas; la facultad de volar, los ayuda a desplazarse rápidamente para ponerse a salvo, para proveerse de alimentos, para buscar el sexo opuesto y perpetuar la especie.

Su poder de reproducción y lo breve de su ciclo biológico los coloca en condiciones de multiplicarse en muy corto tiempo en comparación con los animales mayores. El mimetismo al permitirles tomar forma o color de los objetos cercanos, los hace pasar desapercibidos para sus enemigos naturales y para sus propias víctimas cuando se trata de depredadores.

El cambio de forma, como en el caso de las diferentes etapas de desarrollo es para su protección del medio ambiente, favoreciendo su óptimo crecimiento y la llegada a la adultez.

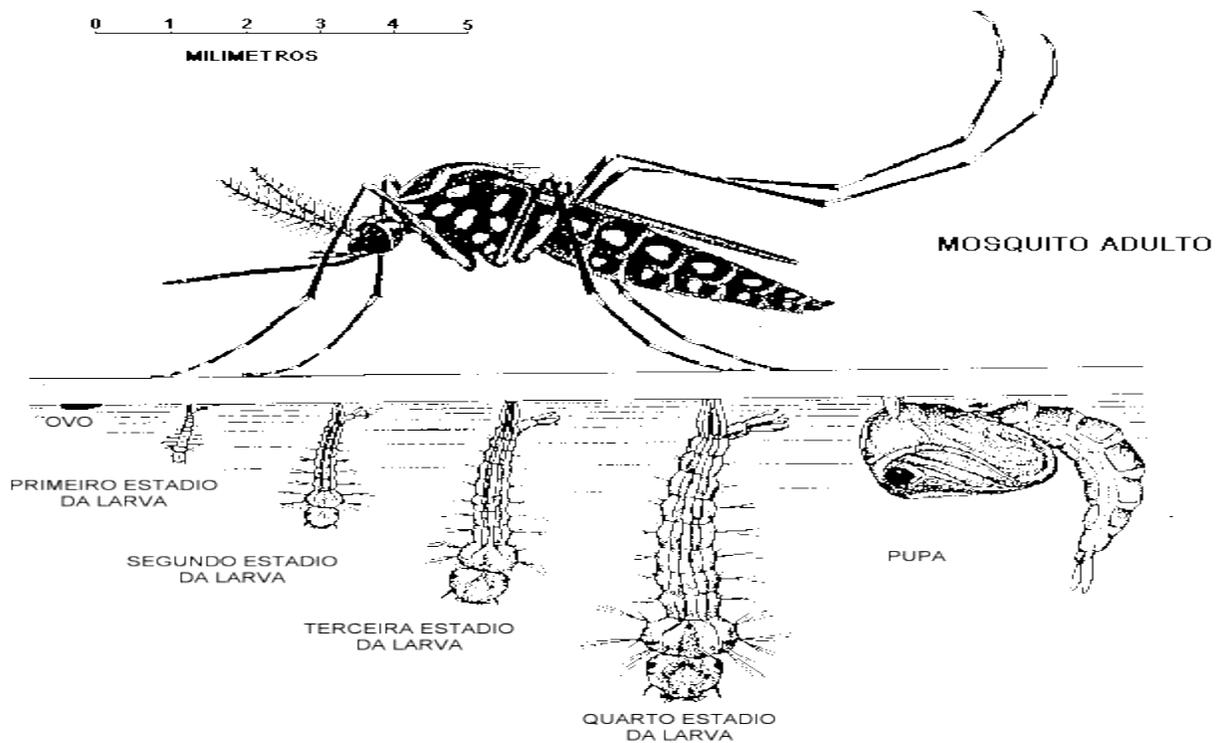


Fig. 10 Ciclo Gonodotrófico del mosquito (http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_notas=567318) Citado Enero 2014

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-

El delito del secuestro actualmente en el país, exige una mayor atención por parte de los administradores de justicia. Desde el punto de vista científico, la Genética Forense ha ido acrecentando sus conocimientos y habilidades, ofreciendo mayores y mejores resultados para la integración de las averiguaciones previas impactando positivamente en la resolución de estos casos.

Enfocados en el indicio biológico, aún en la actualidad, los expertos en la ubicación y manejo de indicios, se dedican a la búsqueda y recolección de aquellos que son más frecuentes, como sangre, saliva, pelos y semen y no consideran importante la presencia de indicios atípicos como son los mosquitos hematófagos, material poco controlado por los delincuentes, que tratados de manera adecuada podrían rendir información valiosa de la persona de quien se alimentaron, misma que pudo haber estado confinada de manera ilícita en alguna casa de seguridad.

Por lo anterior, es de suma importancia en el ámbito de las ciencias forenses, llevar a cabo el análisis de ADN humano obtenido de mosquitos hematófagos (del género *Culisicidae*) con fines de identificación humana para posible aplicación en casos de privación ilegal de la libertad.

La demostración de que sí es posible aislar ADN humano de la calidad y cantidad necesaria obtenido de manera indirecta a través del mosquito, ampliará la variedad de indicios biológicos de los que es posible llevar a cabo la identificación humana.

4. HIPÓTESIS.-

Se obtendrá ADN humano de mosquitos muertos que se alimentaron de personas confinadas en una habitación, pudiéndose tipificar perfiles genéticos completos, parciales y mixtos del DNA extraído de los mosquitos, que coincidirán con uno o varios de los perfiles de referencia de las personas que habitaban dicha estancia.



5. OBJETIVOS.-

- Obtener y caracterizar ADN humano de mosquitos hematófagos
 - Específicos
 - Recolectar los mosquitos de lugares preferentemente habitados por varias personas.
 - Obtener ADN de muestras de referencia provenientes de voluntarios previamente sometidos a picaduras de los insectos.
 - Cuantificar ADN humano.
 - Amplificar ADN humano para obtener perfiles genéticos.
 - Someter los amplicones a electroforesis capilar.
 - Interpretar resultados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.-

El procedimiento general se llevó a cabo con los pasos tradicionales usados en genética molecular aplicada en laboratorios

I.- Recolección de especímenes (mosquitos).

- Se facilitó el acceso de los mosquitos al interior de la casa.
- Se recolectaron en un cuarto donde pernoctaron 9 personas por 3 noches.
- Su recolección fue por muerte natural en diferentes tiempos.
- El secado de los mosquitos fue por medio de papel seda por un día.
- Se identificaron con la letra M de inicio, seguida del número consecutivo asignado al azar.
- Se almacenaron a temperatura ambiente en un sobre de papel para conservar su morfología y evitar contaminación y degradación.
- Se transportaron al laboratorio.



II.- Muestras de referencia

- Las muestras recolectadas proviene de 9 voluntarios.
- La recolección de la muestras fue por punción capilar.
- La muestra se recolecto en papel FTA Microcard (Whatman, GE).
- Se dejaron secar a temperatura ambiente y se resguardaron.
- Las muestras fueron identificadas por la primera letra del nombre de cada uno de los voluntarios.

Fundamento: El papel FTA es un papel filtro (matriz a base de celulosa) especialmente impregnado para la toma de muestras de sangre, saliva u otros fluidos corporales. Provoca la lisis celular, inactivación enzimática, bacteriana y vírica, los inhibidores de la PCR se eliminan fácilmente, con el *FTA-purification reagent*. El ADN queda atrapado y estabilizado en la matriz y permite realizar la PCR sin ninguna purificación o limpieza adicional. Las muestras tomadas con FTA se almacenan de forma indefinida a temperatura ambiente en condiciones de sequedad. (Butler)

III.- Extracción

- Preparación del buffer de lisis “Hair and tissue Extraction”.
- Se adicionan 200 µL de la solución de lisis a la muestra con el mosquito.
- Se incuba la mezcla a 56°C por una hora.

Fundamento: La ruptura de las membranas celulares, se lleva a cabo mediante la incubación en un baño de 56°C con la mezcla de enzima “Proteinasa K” (desnaturaliza las proteínas presentes en las membranas celulares) y DTT que a su vez es un agente reductor desproteinizante para el ADN. Tras este paso el ADN queda liberado del interior de las células.

IV.- Purificación del ADN

- Purificación mediante DNA IQ Casework Pro Kit for Maxell 16 (Promega, Madison, WI, USA).
- El producto de purificación es colectado en 200µL de buffer de elución.
- Se almacena a -20°C hasta el día de la cuantificación del ADN.



Fundamento:

V.- Lavado de las muestras de referencia.

- Las muestras de referencia previamente depositadas en papel FTA MicroCard, son cortadas en pequeños círculos de 1.2 mm de diámetro.
- Se lavan con solución FTA de lavado seguido de dos lavados más con agua desionizada.
- Los pequeños círculos obtenidos una vez ya lavados, son secados y almacenados a temperatura ambiente hasta la amplificación.

6.1. Procedimiento:

Muestras.- de un total de 43 mosquitos en un cuarto compartido por 9 personas, donde los mosquitos murieron en diferentes tiempos, se secaron en papel seda y se mantuvieron a temperatura ambiente. Los mosquitos fueron identificados asignándoles una M y el número correspondiente según el espécimen tomado al azar del total, posteriormente fueron depositados en un sobre para su mayor resguardo.

Las muestras de referencia obtenidas de cada uno de los voluntarios que permanecieron en el cuarto por un periodo de 72 horas fue sangre periférica.

Una vez obtenida la muestra sanguínea de referencia por punción capilar, se colocó en papel FTA Microcard (Whatman, GE), se secaron y guardaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Las muestras de referencia fueron identificadas con las primeras letras de los nombres de los voluntarios con picadura así como el número intralaboratorio asignado a cada persona.

EXTRACCIÓN.- consiste en la rotura de la membrana plasmática, envoltura nuclear para posibilitar la liberación del ADN que se encuentra en el interior. Es el paso más importante ya que del éxito en esta etapa depende que se obtenga finalmente un buen resultado.⁴

El proceso en general debe cumplir con:

- Extraer el ADN
- Purificar el ADN, eliminar la máxima cantidad posible de sustancias contaminantes que puedan interferir con el estudio.



Método.-

Tratamiento previo

La extracción orgánica con fenol-cloroformo es el método más utilizado en la mayoría de los laboratorios de Genética Forense, sobre todo para aquellas muestras en las que se presume que el ADN: ⁴

- Está parcialmente dañado
- Se encuentra en pequeña cantidad
- Contiene una elevada concentración de sustancias contaminantes.

Preparación del buffer de lisis

Los mosquitos fueron tratados con DTT 1M y Proteinasa K (20 mg/ml), buffer de incubación, el buffer de lisis fue preparado con 100µL de Proteinasa K (20mg/ml), 100µL de DTT (1M) y 800 µL de buffer de incubación del kit “Tissue and Hair Extraction” (Promega , Madison, WI, USA).

La solución de lisis preparada (200µL) son adicionados a la muestra e incubada a 56°C por una hora.

El ADN se purificó mediante DNA IQ Casework Pro Kit for Maxell 16 (Promega, Madison, WI, USA). El producto de ADN Purificado es colectado en 200µL de buffer de elución y almacenado a -20°C hasta el día de la Cuantificación del ADN.

Las muestras de referencia previamente depositadas en papel FTA MicroCard, son cortadas en pequeños círculos de 1.2 mm de diámetro, los cuales se lavan con solución FTA de lavado seguido de dos lavados más con agua desionizada. Los pequeños círculos obtenidos una vez ya lavados, son secados y almacenados a temperatura ambiente hasta la amplificación.



CUANTIFICACIÓN.-

Una vez que se ha conseguido extraer el ADN, antes de proceder a analizarlo es necesario saber qué cantidad de ADN se tiene y cuál es su calidad en algunos casos.

Para la PCR es muy importante conocer esta información ya que, tanto el defecto como el exceso de ADN pueden dar lugar a resultados negativos o a problemas en la interpretación de los resultados.

El equipo encargado de realizar la cuantificación es el “Plexor HY” (Promega, Madison, WI, USA), que se usa de acuerdo a las instrucciones.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN.-

Se realizaron utilizando el sistema PowerPlex 16HS System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25µL usando 0.5 ng del ADN molde en 2.5µL de buffer de elusión, 5µL de Buffer de reacción 5X y 15µL de agua grado amplificación para el ADN del mosquito, 17.5 µL de agua grado amplificación para el ADN humano.

La PCR se realizó utilizando el termociclador GeneAmp 9700 Applied Biosystems (Foster City, USA), con las condiciones de amplificación: una incubación inicial a 96°C por 2 minutos; 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 70°C por 45 segundos, 22 ciclos de 90°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 70°C por 45 segundos y una extensión final de 60°C por 50 minutos.

Adicionalmente a la amplificación Multiplex por PCR de los 16 STR loci, se utilizó PowerPlex ESX17 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para 3 muestras de referencia. La PCR se llevo a cabo en un volumen de 25µL usando 0.5 ng del ADN molde hasta 17.5 µL de buffer de elusión, 5µL de la mezcla de reacción PowerPlex ESX 17 5X y 2.5 µL y 2.5 µL de PowerPlex 17 10X mezcla del par de primers.



ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS DE ADN (SECUENCIACIÓN)

Los fragmentos amplificados por PCR son analizados con el analizador ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). En la electroforesis se usa un capilar de 36cm de longitud así como el Polimero 4 (POP 4) como matriz, todo se lleva a cabo 15kV durante 40 minutos a 60°C. Se analizan los fragmentos basado en las escaleras alélicas contenidas en cada Kit de PowerPlex 16HS y PowerPlex ESX17 usando el software GeneMapper (versión 3.2; Applied Biosystems).



RESULTADOS

El método utilizado en este proyecto se aplicó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega[®]) para las técnicas de extracción, purificación, cuantificación de ADN, así como de electroforesis capilar de los amplicones obtenidos.

Material Biológico.



Fig. 1. Mosquitos recolectados en habitación

Se utilizaron mosquitos recolectados en una habitación con acceso a 9 personas.

Recolección de las muestras de trabajo:

Los mosquitos fueron identificados con la numeración ascendente 01 hasta 43, dando un total de 43 mosquitos.

De los 43 mosquitos recolectados sólo 09 de éstos fueron seleccionados para su análisis debido a que no presentaron mutilación, es decir, tenían su anatomía externa completa.

A los mosquitos se les observó con la ayuda de un estereoscopio sin poder determinar sexo para cada uno de ellos, ya que en algunos casos no se diferenciaban con exactitud algunos órganos diferenciales entre ambos sexos, como lo es la probóscide y tamaño.

Los mosquitos recolectados se encontraban muertos, no se utilizó insecticida ni cualquier otro método para provocar su muerte.

Con respecto a las muestras de referencia, se tomaron muestras sanguíneas en papel FTA Whatman[®] de nueve personas con acceso a la habitación, en la que estuvieron alrededor de 3 noches pernoctando.



La sensibilidad de la amplificación por PCR para el panel utilizado es de 0.3 ng de ADN humano, sin embargo se pueden obtener perfiles parciales de muestras que contengan menos de 0.3ng de ADN.

Para conocer la cantidad de ADN y la presencia de inhibidores se utilizó el kit Plexor HY System[®], con el cual se determinó con qué muestras se podría obtener el perfil genético debido a la cantidad de ADN humano presente en las mismas, al mismo tiempo que proporciona la información para descartar las muestras con las cuales no se obtendría un perfil genético debido a la presencia de inhibidores o a la escasa cantidad de ADN.

Tablas de perfiles

Los resultados obtenidos de los alelos tanto de las muestras de referencia como los perfiles de los mosquitos se distribuyeron en tablas para su mejor comprensión y ordenamiento. Se realizaron tablas indicando el sistema o panel empleado, los marcadores que usa dicho sistema así como la identificación de las muestras analizadas. En otra de las tablas se demuestra la confronta del perfil completo que se dio entre muestra de referencia y mosquito recolectado, así como del perfil incompleto y otros dos perfiles que no coinciden con las muestras de referencia.



TABLAS DE MARCADORES DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIAS

MARCADORES	BETO B-01	ELIAS H-02	IVAN I-04	OLGA O-05	SAM S-07	VANE V-08	YAMIL Y-09
Power Plex 16HS							
D3S1358	15, 16	15,15	15,15	15,15	16	15, 16	15, 18
TH01	9.3, 9.3	9.3, 9.3	7	6, 9.3	6, 8	6, 9.3	6, 9.3
D21S11	30, 32.2	30,30	29, 32.2	30,30	30, 32.2	30, 32.2	30, 30
D18S51	12, 19	12, 17	13, 16	12, 17	12, 18	12, 19	16, 17
PENTA E	7, 14	7, 14	15, 16	12, 14	14, 16	14, 14	14, 14
D5S818	9, 11	11, 12	11	12, 12	9, 12	9, 12	11, 12
D13S317	11, 11	9, 11	9, 12	9, 13	11, 11	9, 11	11, 13
D7S820	9, 12	12, 12	10, 12	11, 12	10, 12	11, 12	9, 12
D16S539	11, 13	11	10, 13	11, 13	9, 13	13, 13	11, 13
CSF1PO	10, 11	10, 12	11, 12	9, 12	9, 10	9, 10	10, 10
PENTA D	13, 15	11, 13	9, 10	11, 13	11, 14	11, 15	8, 13
AMELOGENINA	X, Y	X, Y	X, Y	X, X	X, X	X, X	X, X
Vwa	16, 17	15, 17	16, 17	15, 16	16, 17	16, 17	15, 16
D8S1179	14, 15	15, 16	13, 14	13, 16	10, 16	15, 16	13, 15
TPOX	8,8	8, 12	8, 11	10, 12	8, 10	8, 10	8, 12
FGA	23,23	20, 23	21, 25	20, 26	24, 26	24, 26	23, 26

Tabla 1. Tipificación del ADN de las muestras de referencia con PowerPlex 16HS System



MARCADORES	ROSA R-06	HECTOR H-03
Power Plex 17ESX		
D3S1358	15, 18	15, 18
TH01	6, 7	7, 9.3
D21S11	29, 30	29, 30
D18S51	15, 16	12, 16
D10S1248	13, 15	13, 13
D1S1656	16, 16	16, 17
D2S1338	19, 25	23, 25
D16S539	10, 13	10, 11
D22S1045	14, 16	16, 16
D2S441	10, 11	10, 14
D12S391	17.3, 19	17.3, 21
AMELOGENINA	X, X	X, Y
Vwa	15, 16	15, 15
D8S1179	13, 13	13, 15
SE33	27.2, 27.2	27.2, 28.2
FGA	25, 26	20, 25

Tabla 2. Tipificación del ADN de las muestras de referencia con PowerPlex 17ESX System.



TABLA DE MARCADORES DE LAS MUESTRAS PROVENIENTES DE LOS MOSCOS

MARCADORES	MOSCO M-02	MOSCO M-05	MOSCO M-15	MOSCO M-22
Power Plex 16HS				
D3S1358	16	15	15, 16	?
TH01	6, 8	7	7	9.3
D21S11	30, 32.2	29, 32.2	NA	?
D18S51	12, 18	NA	13, 17	17
PENTA E	14, 16	NA	NA	?
D5S818	9, 12	11	7, 9	12
D13S317	11	9, 12	12	11
D7S820	10, 12	10, 12	10	11
D16S539	9, 13	10, 13	9	14
CSF1PO	9, 10	11, 12	9, 12	NA
PENTA D	11, 14	9	NA	?
AMELOGENINA	X	X, Y	X, Y	X
Vwa	16, 17	16, 17	16, 17	16
D8S1179	10, 16	13, 14	14	NA
TPOX	8, 10	8, 11	NA	NA
FGA	24, 26	21, 25	NA	NA

Tabla 3. Tipificación de ADN humano a partir de mosquitos utilizando PowerPlex 16HS System.
NA= sin producto de amplificación; ?= producto de amplificación por debajo del umbral de la altura del pico



Obtención de perfil completo

Con relación al match entre las muestras de referencia y el perfil obtenido a partir del mosquito, se tienen los siguientes resultados:

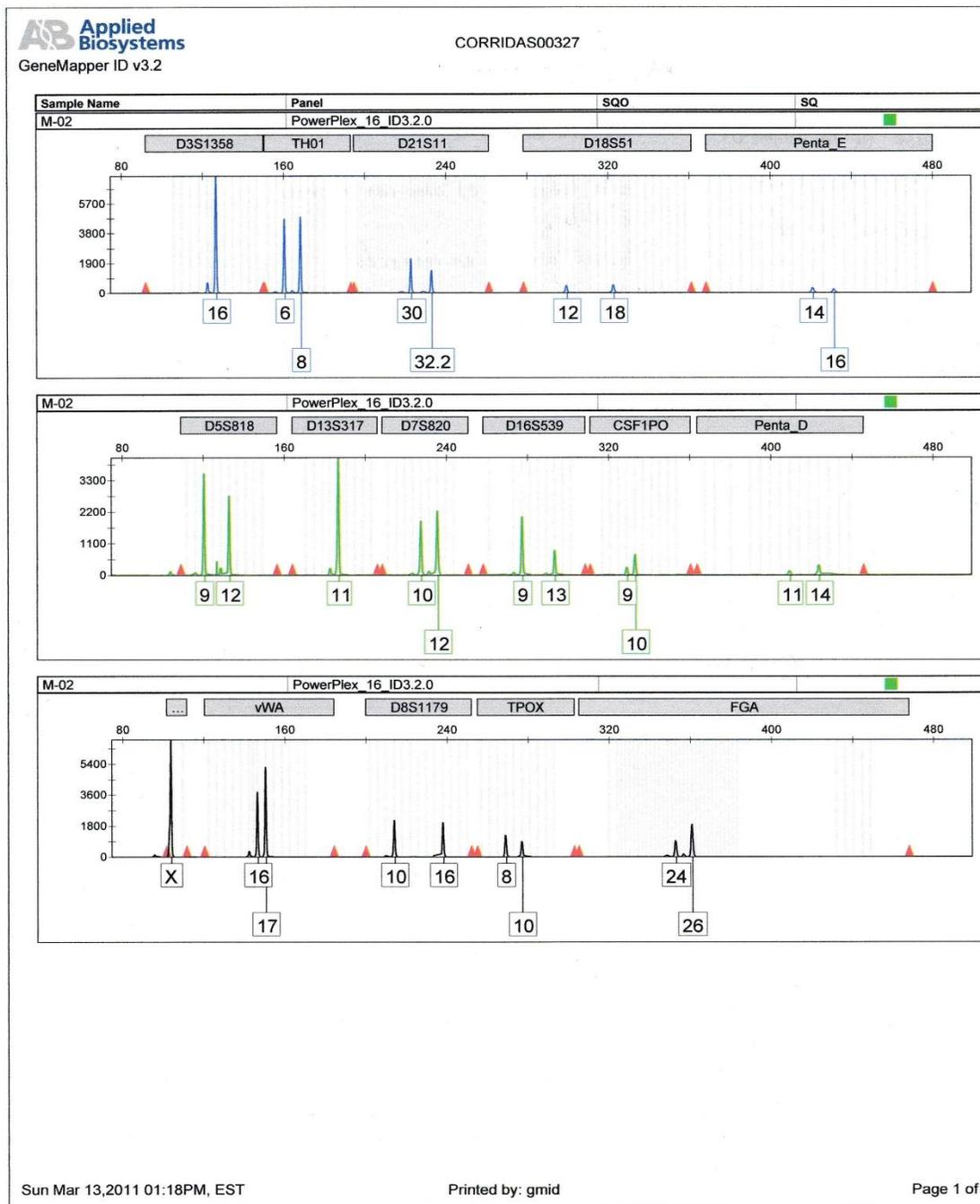


Fig. 2 Electroferograma del mosquito identificado como M2.



Electroferograma completo de muestra de referencia

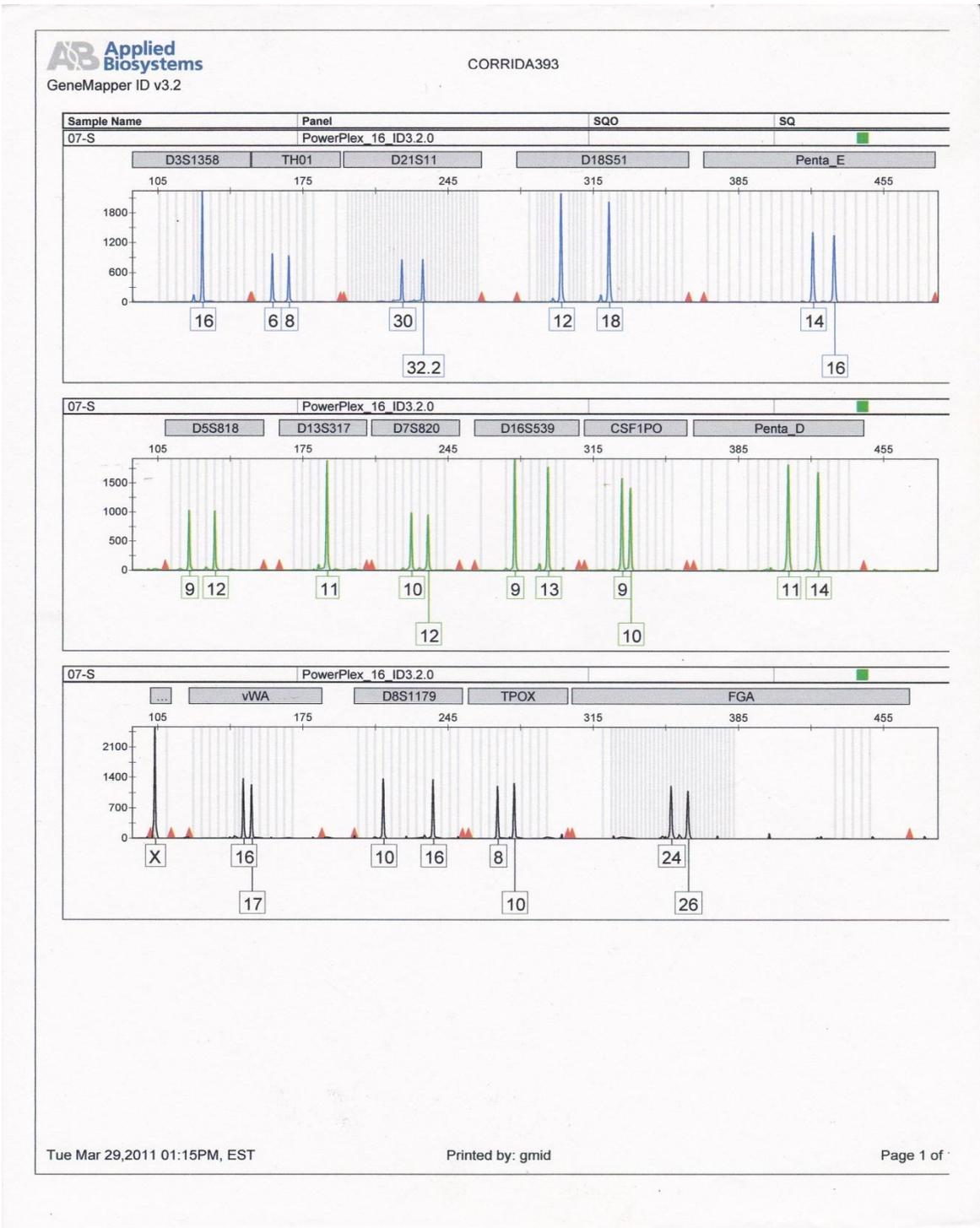


Fig. 3 Electroferograma del voluntario número 7 (07-S)



Tabla comparativa donde se muestra el match entre el mosquito y la muestra de referencia.

MARCADORES	MOSCO M-02	SAM S-07
Power Plex 16HS		
D3S1358	16	16
TH01	6, 8	6, 8
D21S11	30, 32.2	30, 32.2
D18S51	12, 18	12, 18
PENTA E	14, 16	14, 16
D5S818	9, 12	9, 12
D13S317	11	11
D7S820	10, 12	10, 12
D16S539	9, 13	9, 13
CSF1PO	9, 10	9, 10
PENTA D	11, 14	11, 14
AMELOGENINA	XX	XX
Vwa	16, 17	16, 17
D8S1179	10, 16	10, 16
TPOX	8, 10	8, 10
FGA	24, 26	24, 26

Tabla 4. Match entre la muestra de referencia S-07 y el perfil obtenido del mosco M-02

El electroferograma correspondiente a este mosquito, muestra un perfil femenino, un desequilibrio intra e interlocus y la degradación del ADN. Sin embargo, los picos resultantes estaban por encima del umbral de la altura establecido por el laboratorio (100 RFUs). El perfil coincide plenamente con el número de la muestra de referencia 7, lo que indica que el mosquito número dos era un insecto hembra que se alimentó de la persona denominada número 7 (SAM).



Electroferograma parcial de mosquito

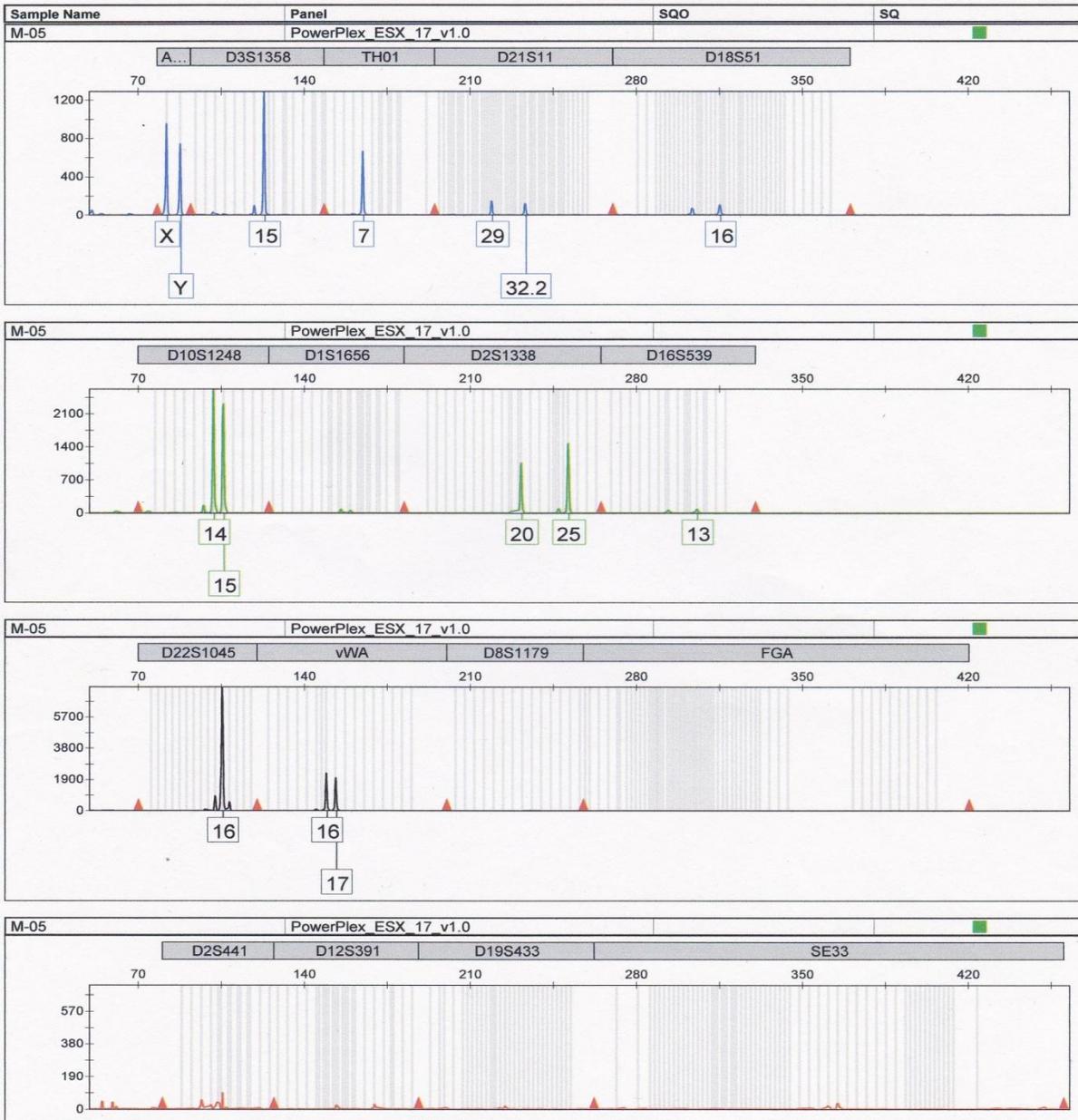


Fig. 4 Electroferograma del mosquito identificado como M5.



Electroferograma completo muestra de referencia

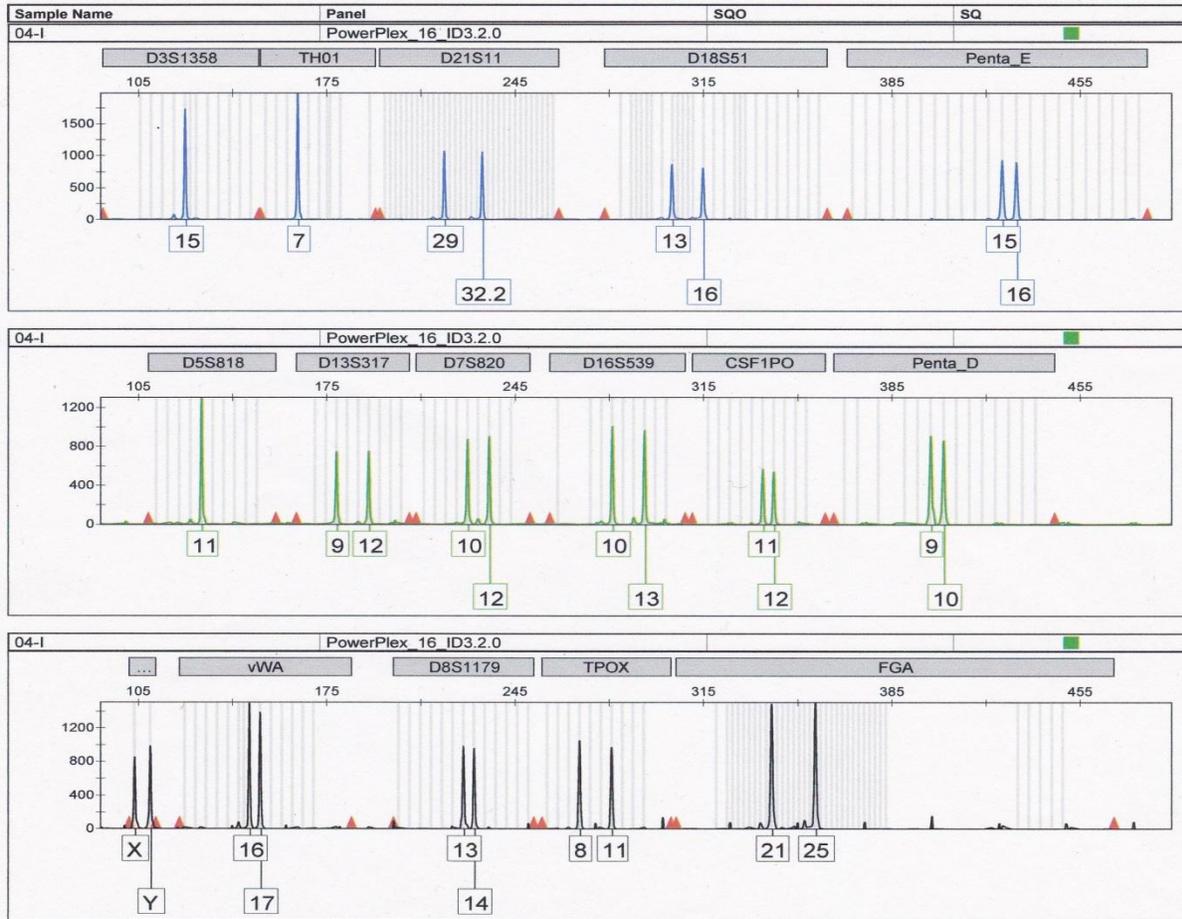


Fig. 5 Electroferograma del voluntario 4 identificado como 04-I



En cuanto al mosquito número M-05, se obtuvo un perfil parcial,(ver electroferograma fig.) donde se observa el fenómeno denominado *allele drop outs*, que demostrativamente se traducen como pérdidas alélicas, esto debido a poco ADN contenido en la muestra, por último se demuestra que no existen pruebas de una fuente humana secundaria (contaminación). Se determinó que el insecto denominado M-05 se alimentaba de la muestra 04-I, correspondiente a un hombre.

Discusión.-

Se puede obtener ADN humano a partir de una amplia variedad de fuentes biológicas. Tal es el caso de los mosquitos hematófagos hembra con fines forenses.

En las causas penales que involucran a personas desaparecidas, se deben investigar fuentes biológicas atípicas. Las organizaciones criminales han ido transformando sus actividades de una manera más sofisticada de operar con el fin de limpiar todo rastro que puede guiar a su arresto. Por esta razón, es importante encontrar evidencia relacionada con vestigios humanos con el propósito de comparar las muestras de referencia de la víctima o de las víctimas con los padres o hijos que permitan a la policía inferir que una persona desaparecida fue confinada en una habitación específica.

Por otro lado, y en el mismo orden de ideas, sería posible conocer la información biológica de los delincuentes.

El estudio de ADN humano se llevó a cabo con mosquitos secos, dado que las hembras son hematófagas, las muestras de ADN observadas provenían de mosquitos hembras. En virtud de que no hubo una separación previa entre mosquitos machos y hembras, todos los mosquitos recolectados fueron utilizados en la extracción de ADN. La baja tasa de éxito en la tipificación de ADN humano de los mosquitos analizados, se debe a que fueron incluidos mosquitos machos en este ensayo.

Se obtuvo un perfil completo del mosquito número dos que coincidió con la muestra de referencia número 7 (SAM), lo que demuestra que los mosquitos hematófagos hembra podrían ser una fuente de ADN humano.

No obstante, que la degradación se observó en varios mosquitos, es posible identificar perfiles parciales.

Es pertinente hacer notar que la degradación observada en los perfiles parciales es atípica, dado que la degradación típica afecta significativamente a los alelos más grandes, mientras que en muchas ocasiones, los alelos más cortos son más resistentes a la degradación. En este caso, observamos alelos cortos en pequeña cantidad, y alelos más grandes en un genotipo heterocigótico (sin pérdidas alélicas).



En este estudio hemos demostrado que a partir de un solo mosquito se puede obtener suficiente ADN humano, pudiendo ser aislado y tipificado para propósitos forenses utilizando técnicas de PCR modernos.

Varios casos criminales de confinamiento, como el secuestro, donde agresor y víctima compartieron una habitación durante periodos largos de tiempo pueden ser investigados una vez que las puertas y ventanas están cerradas y los mosquitos no pueden entrar o salir de la habitación.

El éxito de la investigación depende de la celeridad y la eficiencia del equipo de criminalística de campo para llegar a la escena del crimen tan pronto como la víctima o delincuente han salido de la habitación.

El ADN extraído del mosquito puede ser una evidencia crítica para identificar víctima o delincuente, en donde no se tienen otras evidencias como un cuerpo, manchas, pelo o cualquier otra fuente de evidencia disponible en humanos.

CONCLUSIONES

- Es posible la extracción y aislamiento de ADN humano a partir de mosquitos hematófagos hembra, utilizando técnicas fluorescentes de alta sensibilidad y el análisis computacional de los resultados pudiendo facilitar la interpretación de los casos complejos.
- Se demuestra la alternativa del uso del mosquito como indicio biológico siendo una herramienta útil en el ámbito de la genética forense, aportando mayores pruebas que contribuyan con un mejor veredicto por parte de los jueces o encargados de prevalecer la ley.
- Se recomienda extender el uso de los insectos como material de investigación no sólo como indicativo en la hora de muerte en entomología, sino también como material sensible significativo para la obtención de ADN humano.



ANEXO 1.- PERFILES GENÉTICOS DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA.

Electroferograma 1

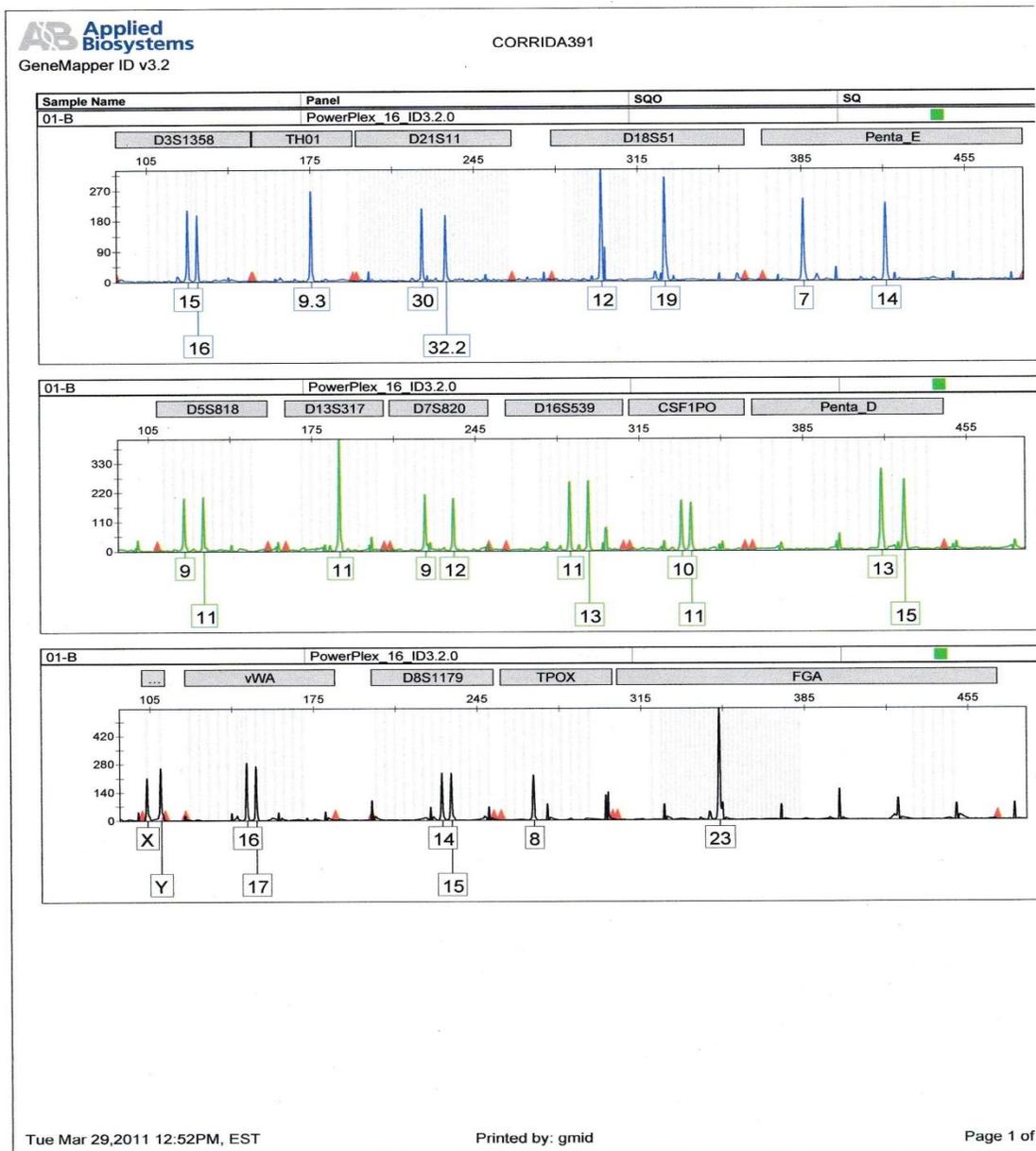


Fig. Electroferograma de referencia denominado 01-B

Electroferograma 2

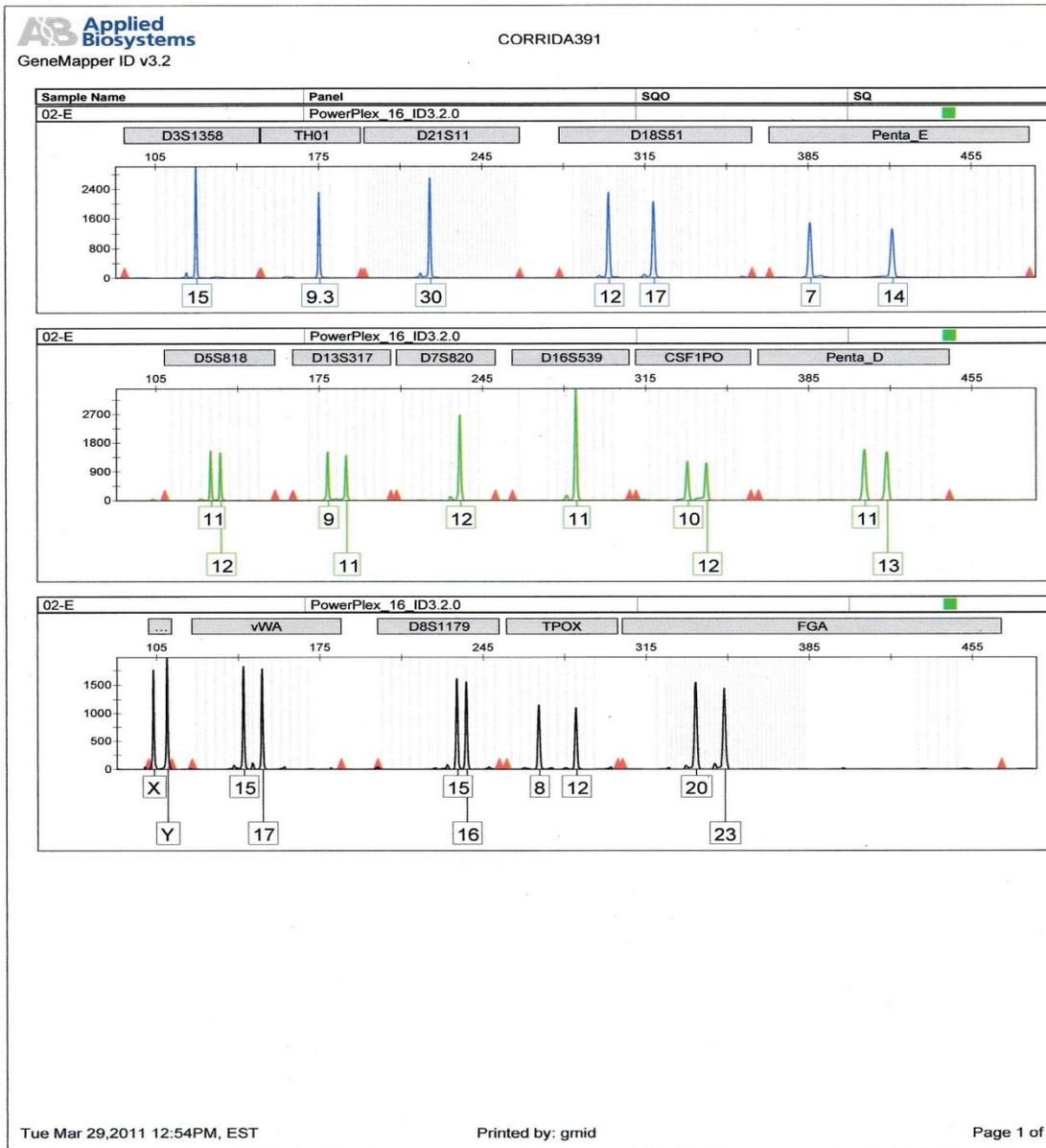


Fig. Electroferograma de referencia denominado 02-E

Electroferograma 3

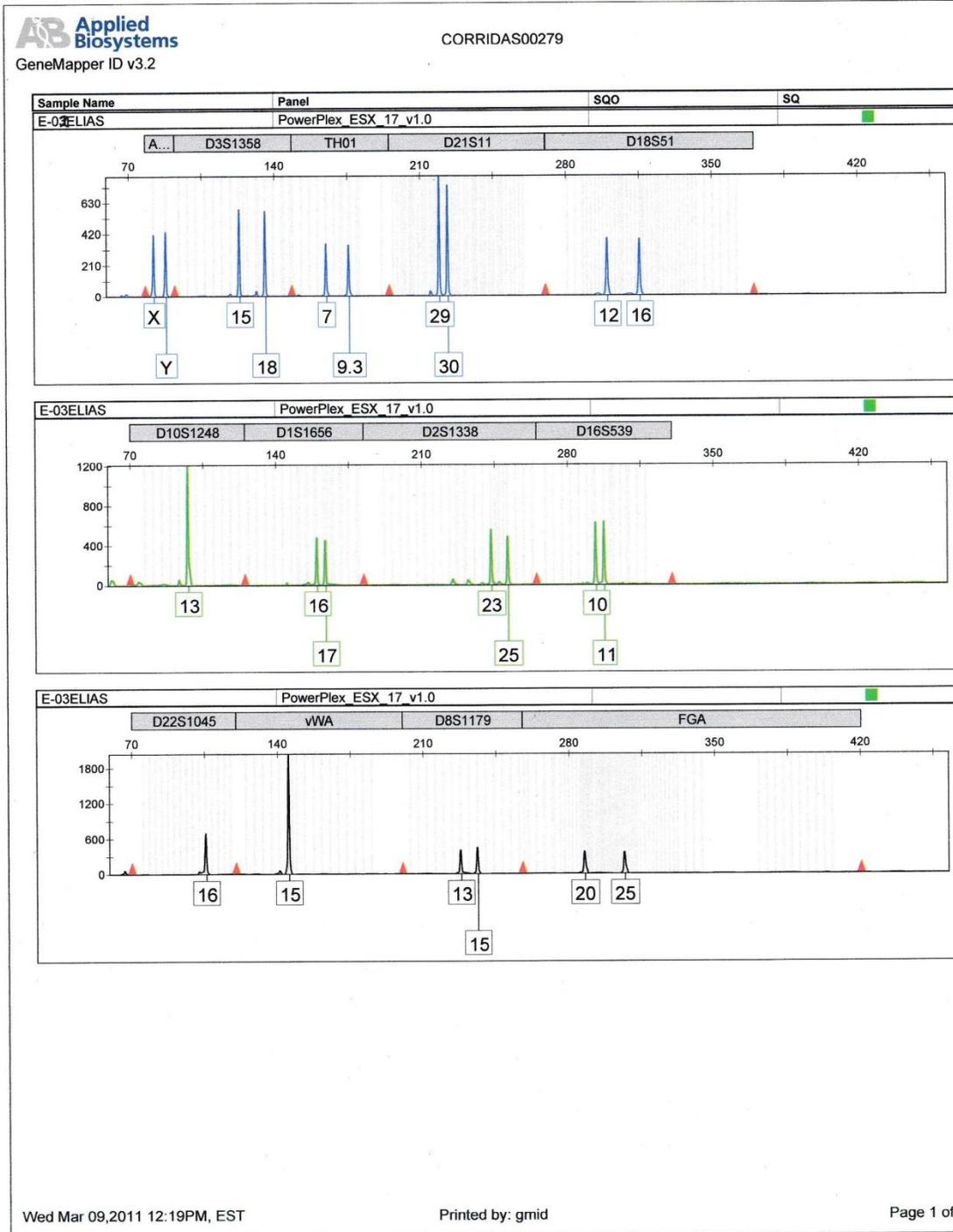
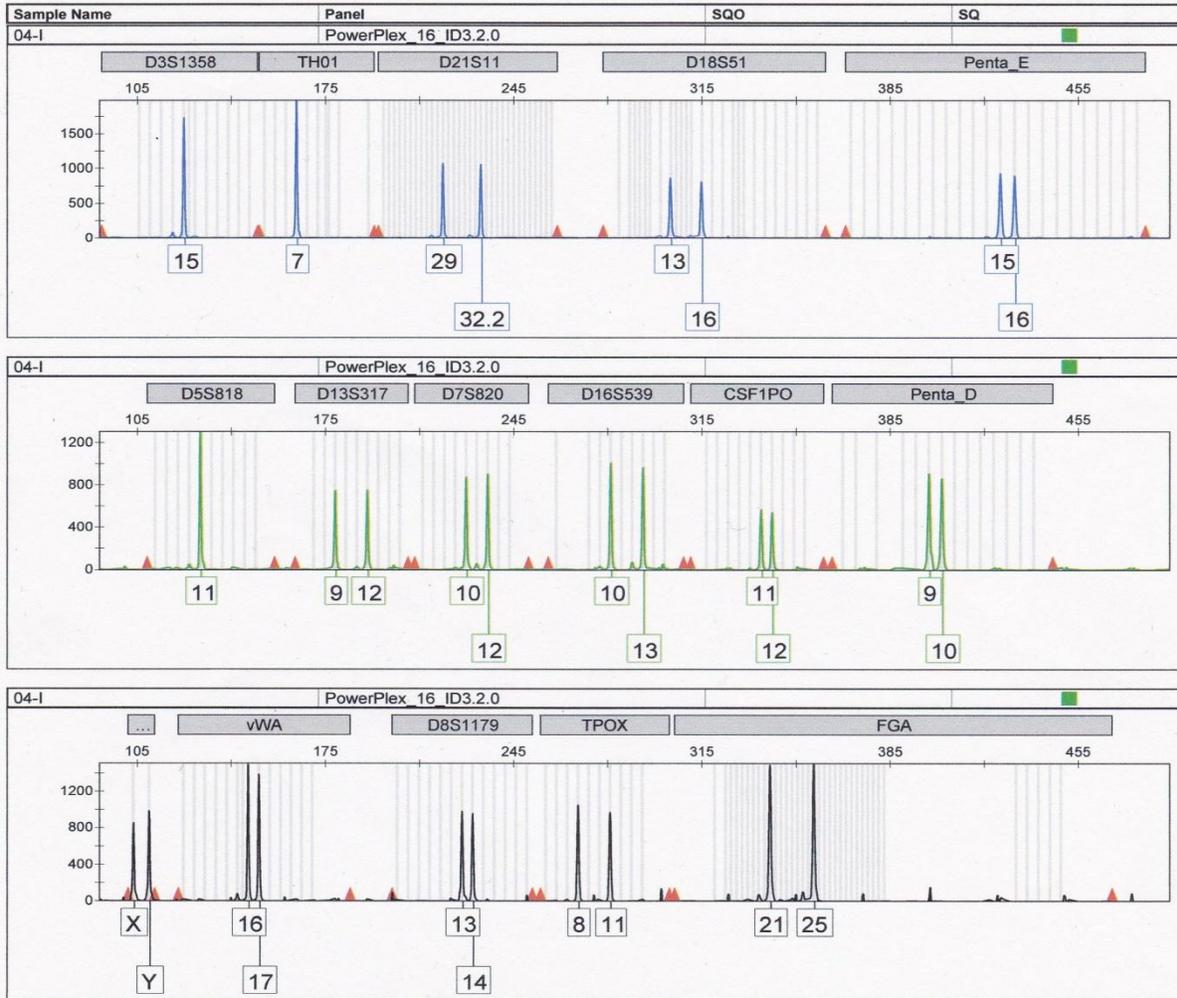


Fig. Electroferograma de referencia denominado 03-E

Electroferograma 4

Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

CORRIDA392



Tue Mar 29, 2011 01:04PM, EST

Printed by: gmid

Page 1 of 1

Fig. Electroferograma de referencia denominado 04-I

Electroferograma 5

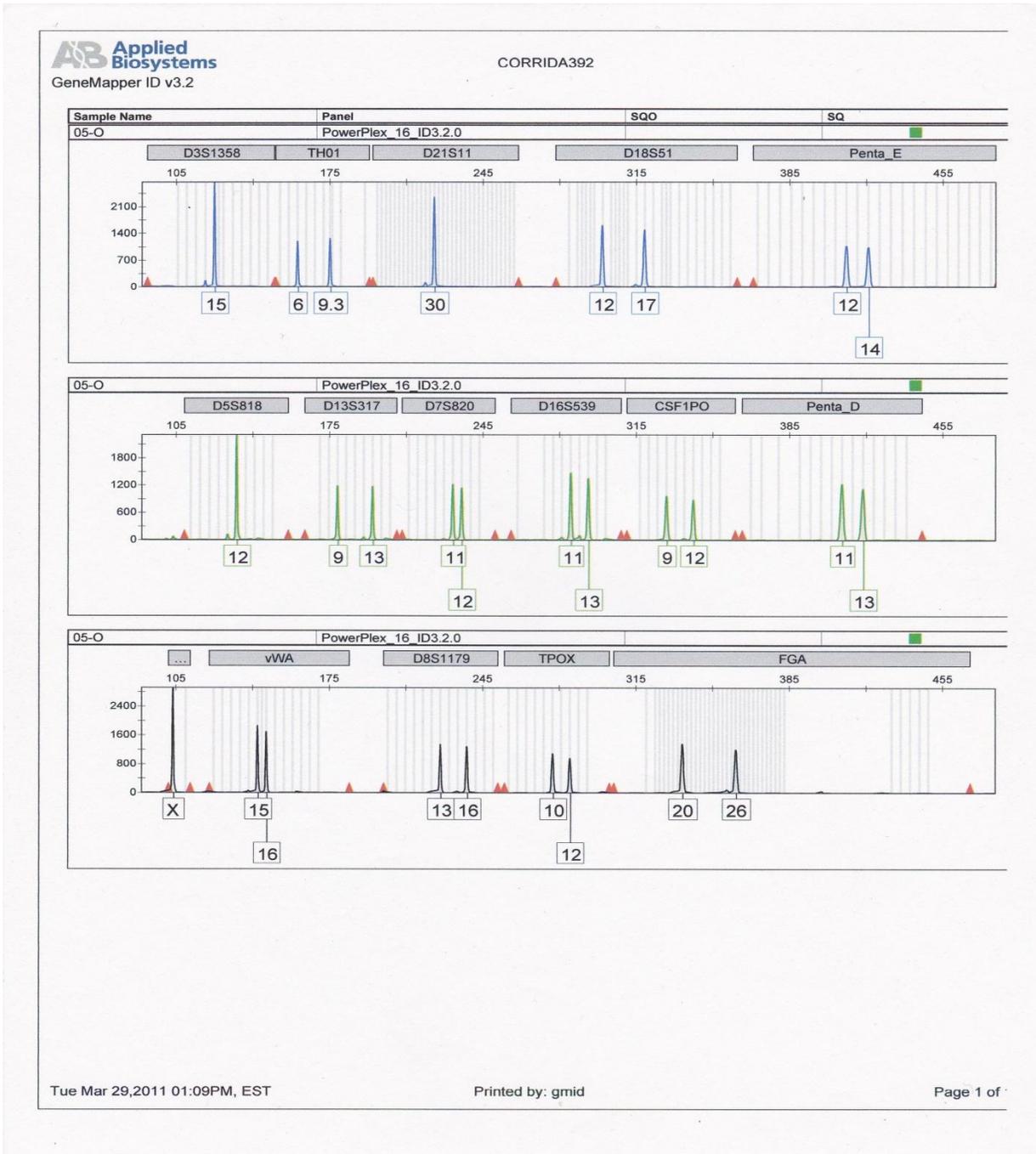
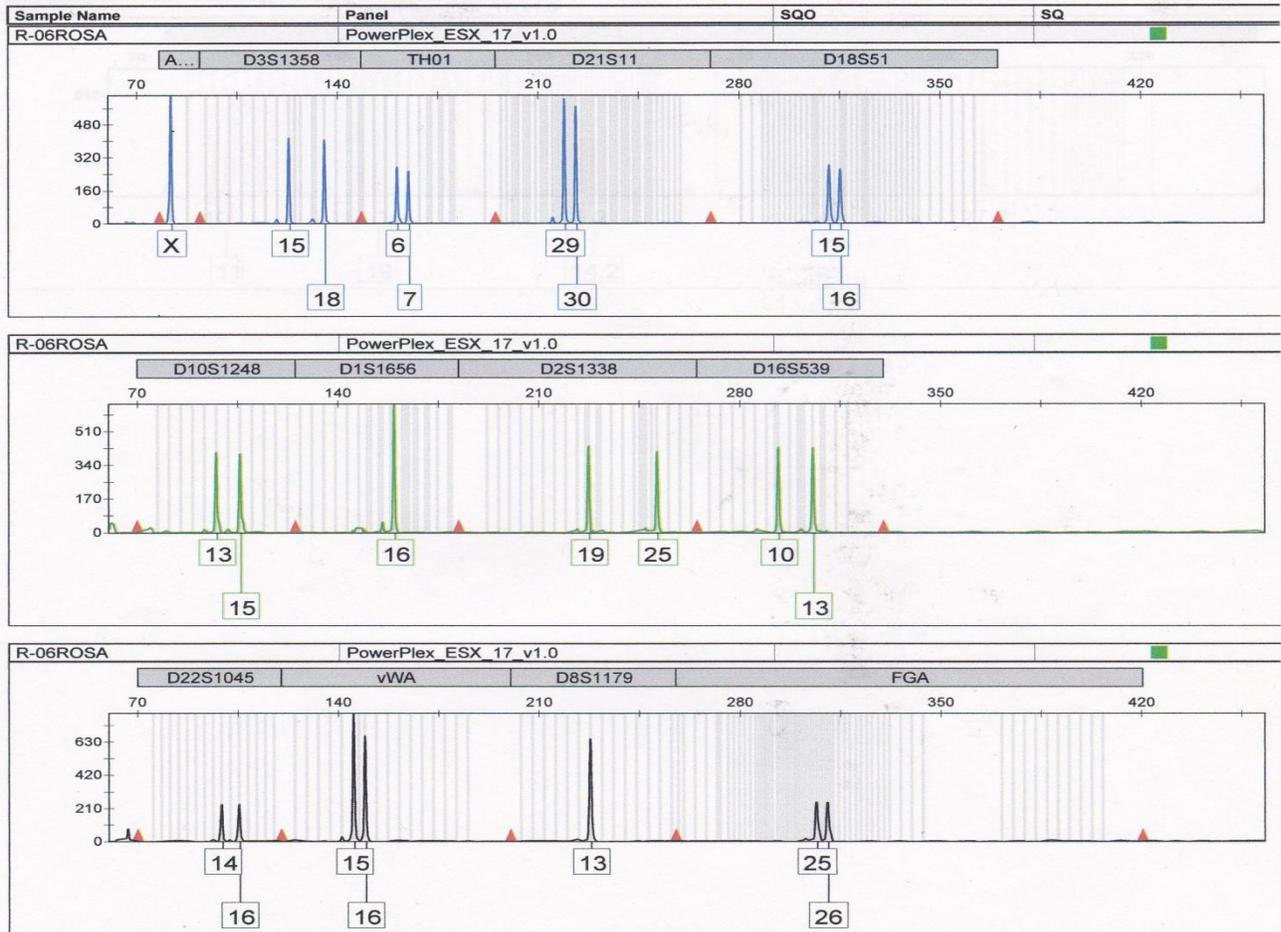


Fig. Electroferograma de referencia denominado 05-O

Electroferograma 6

Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

CORRIDAS00280



Wed Mar 09,2011 12:23PM, EST
Wed Mar 09,2011 12:23PM, EST

Printed by: gmid
Printed by: gmid

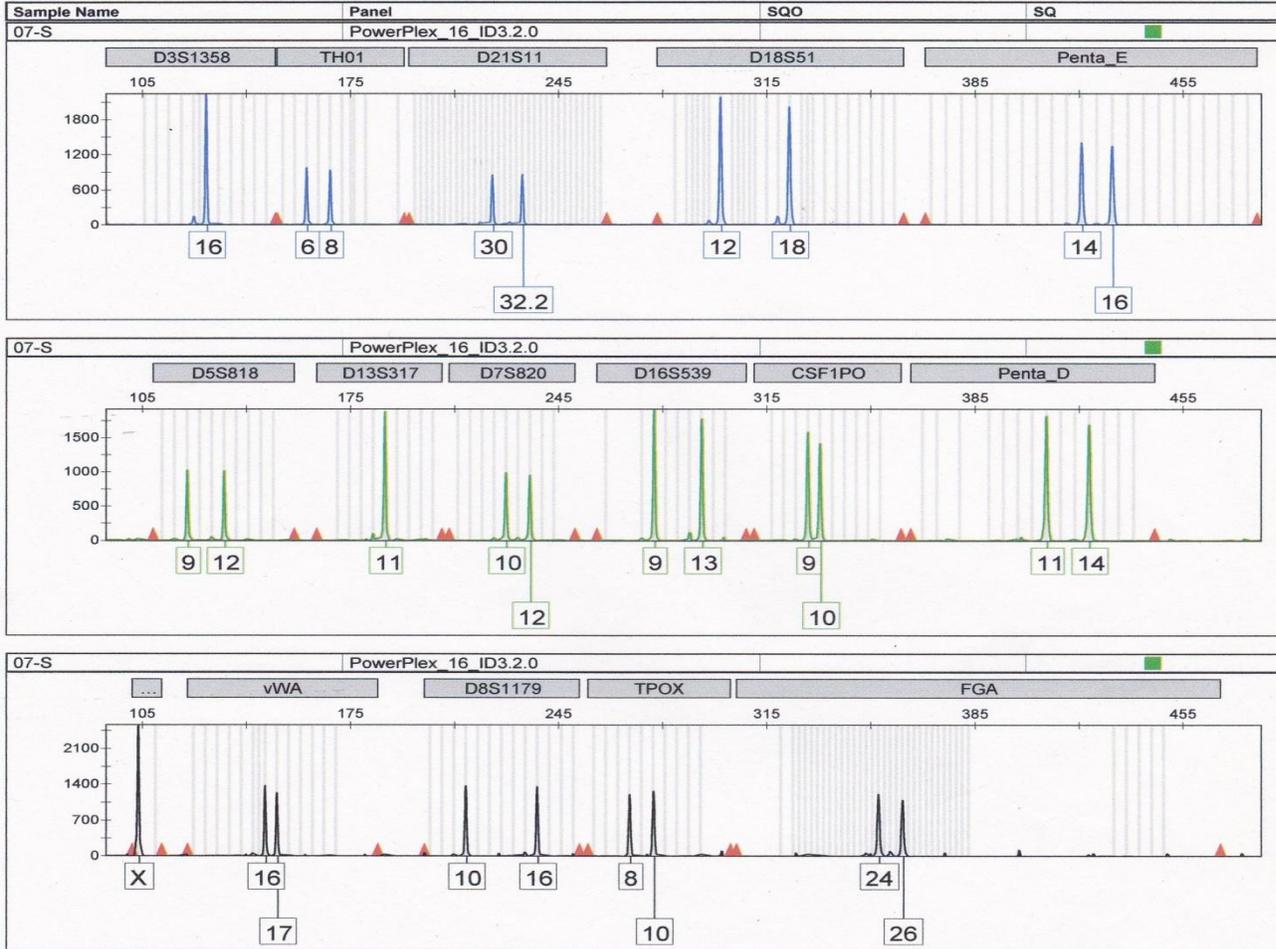
Page 1 of 2
Page 1 of 2

Fig. Electroferograma de referencia denominado 06-R

Electroferograma 7

Applied Biosystems
GeneMapper ID v3.2

CORRIDA393



Tue Mar 29, 2011 01:15PM, EST

Printed by: gmid

Page 1 of 1

Fig. Electroferograma de referencia denominado 07-S

Electroferograma 8

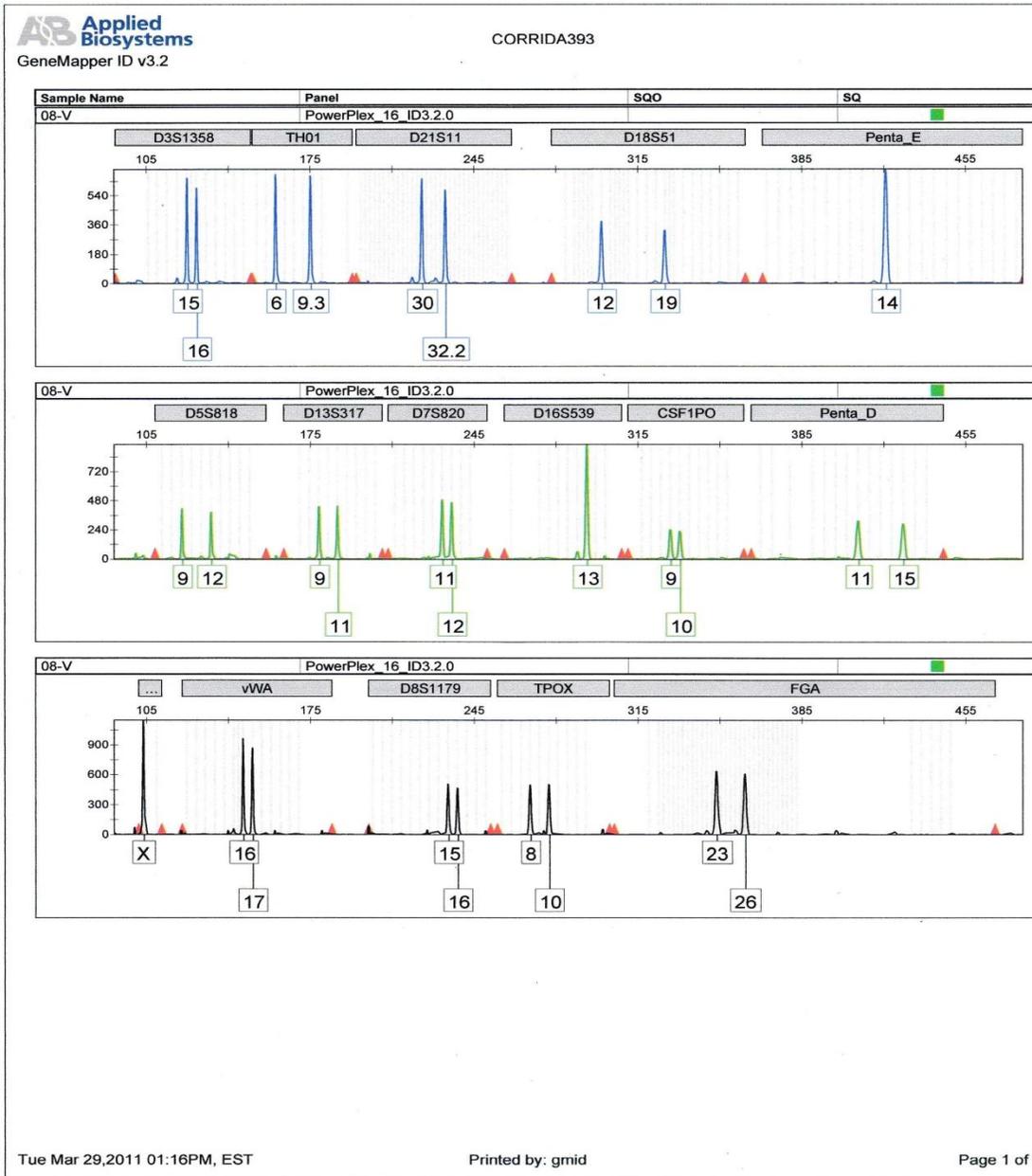


Fig. Electroferograma de referencia denominado 08-V

Electroferograma 9

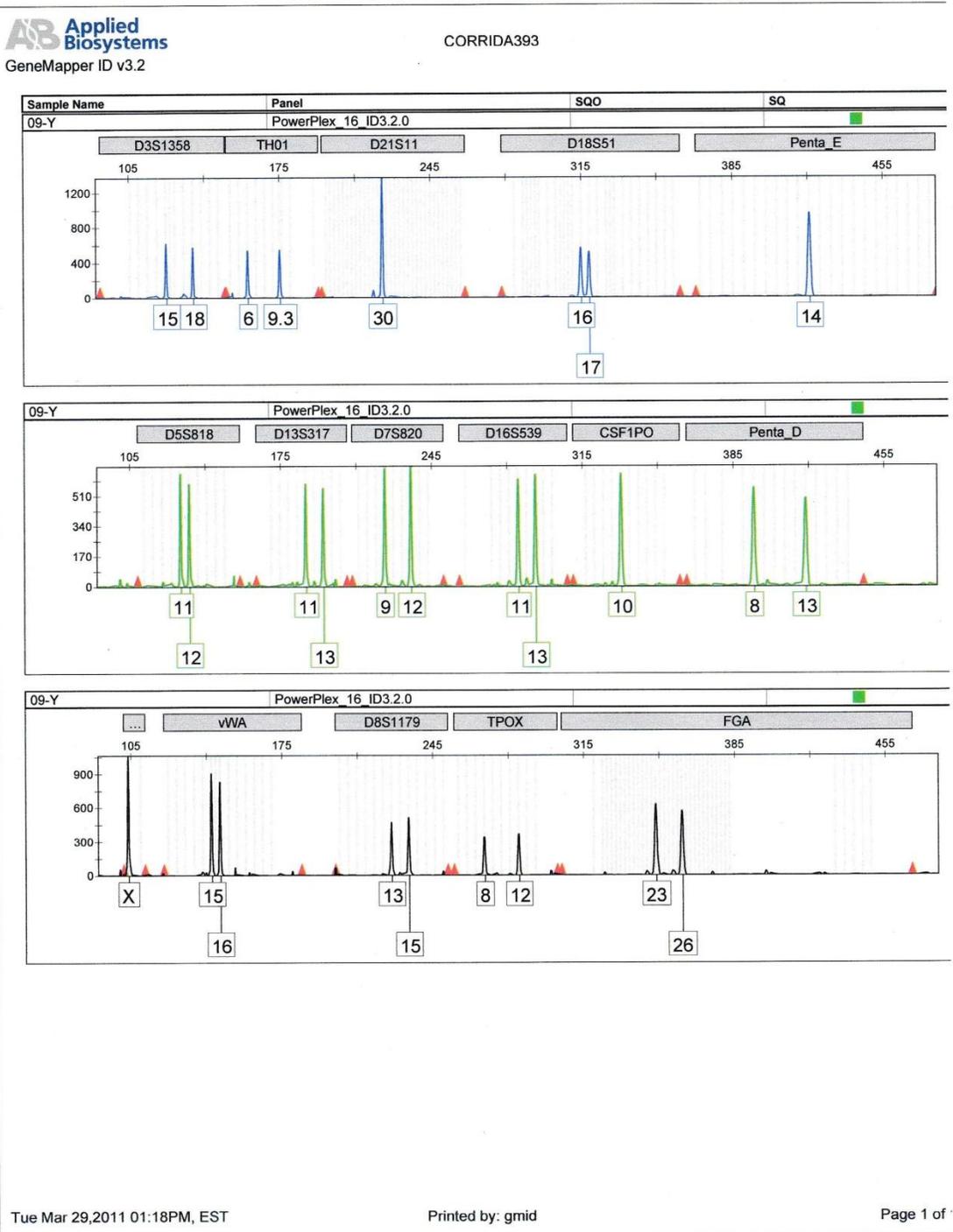


Fig. Electroferograma de referencia denominado 09-Y

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 y 10 000 y cuyo tamaño es de 16 569 pb.

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 no codificante:

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.

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

Amplicon: pieza o parte de ADN o ARN que es la fuente o el producto de amplificación de eventos de replicación naturales o artificiales.

Amplificación: producción de una o más copias de un fragmento genético o secuencia diana.

Cadena de custodia.- comprende el proceso de identificación, ubicación, fijación, levantamiento, embalaje, etiquetado, traslado, estudio y análisis del material sensible significativo hallado en el escenario delictuoso.

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

Ciencia Forense: Definiciones actuales de ciencia forense la denotan como “el conjunto estructurado y sistematizado de conocimientos, de carácter técnico y científico, generados por la investigación y análisis de los indicios de un hecho probable delictuoso, con la finalidad de presentar esos resultados ante la autoridad jurídica, correspondiente y coadyuvar en la prevención del delito y, en la procuración y administración de la justicia”.

Criminalística.- es la disciplina que aplica fundamentalmente a los conocimientos, métodos y técnicas de investigación de las ciencias naturales en el examen del material sensible significativo relacionado con un presunto hecho delictuoso, con el fin de determinar, en auxilio de los órganos encargados de administrar justicia, su existencia, o bien reconstruirlo, o bien señalar y precisar la intervención de uno o

varios sujetos en el mismo (introducción a la Criminalística – Moreno González – Porrúa).

Criminalística de campo.- se entiende a la investigación que se lleva a cabo en el propio lugar de los hechos (Manual de Métodos y Técnicas empleadas en Servicios Periciales - ed. Porrúa PGJDF)

Criminalística de laboratorio.- es la que se realiza en los laboratorios de criminalística donde se encuentran los instrumentos usados para el examen de los indicios, ya sea, en ocasiones, con fines de identificación o cuantificación. Se trata de la parte fina de la investigación. (Manual de Métodos y Técnicas empleadas en Servicios Periciales - ed. Porrúa PGJDF).

Criminología.- Estudia el delito, al delincuente, la delincuencia y del tratamiento para la posible readaptación social del autor del hecho.

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 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 pertenecientes a los 22 pares restantes.

Deleción: 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.

Electroferograma: gráfico realizado con los resultados del análisis por electroforesis.

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.

Evidencia: es todo indicio que habiendo sido estudiado, comprueba su relación con el hecho y demuestra o comprueba total o parcialmente la existencia del mismo y la relación víctima – victimario.

Gen: secuencia completa de ADN necesaria para dirigir la síntesis de un producto final. 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 (pb).

Genotipo: combinación alélica en un locus determinado.

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

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

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

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

Hibridación: proceso por el que dos cadenas de ADN complementarias 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 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.

Indicio: todo elemento que una vez levantado en el lugar de los hechos, guarda relación directa o indirecta con el hecho y puede ser parte importante en la comprobación del mismo.

Indicio biológico: toda sustancia líquida o sólida que provenga directamente del cuerpo humano o que haya estado en contacto con el mismo y en cuya superficie o interior pueda haber restos de células.

Intrón: región del ADN que debe ser eliminada de la transcripción primaria de ARN, a diferencia de los **exones** que son regiones que codifican para una determinada proteína.

Ladder: conjunto de estándares que se utilizan para identificar el tamaño aproximado de una molécula que corre en un gel durante la electroforesis.

Loci: son los dos sitios homólogos sobre los cromosomas homólogos, es decir, son los dos locus.

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

Lugar de los hechos: sitio donde se ha cometido un ilícito y en donde se encuentran los indicios y evidencias. También se le conoce como el lugar del delito, escena del crimen. El propósito fundamental de su estudio es lograr tanto la reconstrucción del hecho como su verdad histórica.

Lugar del Hallazgo.- Corresponde a un espacio donde encontramos los indicios que puedan estar relacionados con algún hecho – por ejemplo el hallazgo de un cadáver – pero este sitio no va a corresponder al lugar donde sucedió el presunto hecho delictuoso.

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

Material sensible significativo: en la práctica, es todo elemento o cosa susceptible que se encuentre en el lugar de los hechos, que puede ser estudiado en el laboratorio, que pudiera ser de utilidad en la investigación y que debe de ser integrado en la cadena de custodia por el investigador.

Se denomina “material” por ser un elemento, huella o sustancia en cualquier estado sólido, líquido o gaseoso, con características propias y que puede estar presente en el escenario del crimen o hallazgo. El adjetivo “sensible” obedece a que se percibe por medio de los sentidos y alude a la capacidad y facilidad que tiene para ser modificado, cambiado o destruido. “significativo” se utiliza para hacer notar e importancia en el investigación del escenario del crimen o del hallazgo. De alterarse, modificarse o desaparecer este último, se puede perder su relación con el hecho que se investiga, entorpeciendo el esclarecimiento de éste y con ello dificultar el llegar o no a la *verdad histórica del delito*.

Dependiendo su origen orgánico e inorgánico se subclasifican en determinable, indeterminable, asociativo y no asociativo.

Material sensible significativo Determinable: Aquel que por su naturaleza no requiere del análisis completo de su composición y estructura para identificarlo. Sólo basta un examen macroscópico cuidadoso y minucioso, ocasionalmente auxiliado por un lente

de aumento. Éstos guardan una relación directa con el objeto o persona que los produjo. Ejemplo: huellas dactilares, la escritura, la firma, las armas blancas, las armas de fuego, las balas y los casquillo, entre otros.

Material sensible significativo indeterminable: Aquel que por su naturaleza física requiere de un análisis completo para conocer su composición y estructura, debido a que macroscópicamente no es posible identificarlo ni definirlo. Generalmente consiste en sustancias de origen natural y químico, como sedimentos en recipientes, pastillas desconocidas con o sin envoltura, productos medicamentosos sueltos, manchas en general, maculaciones de sangre, semen, vomito, meconio y orina, etc.

Material sensible significativo asociativo: se encuentra en el escenario del crimen o del hallazgo y guarda relación directa con el hecho que se investiga.

Material sensible significativo no asociativo: se encuentra y se puede apreciar en los escenarios ya sea del crimen o del hallazgo, pero no tiene relación alguna directa o indirecta con el hecho que se investiga.

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.

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 translocación de un fragmento de ADN.

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

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

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

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

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

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

Polimorfismo: variación en el ADN entre individuos de una misma especie. Se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más de un 1% de la población. Existen dos tipos de polimorfismos:

De longitud: los alelos de un locus se diferencian entre ellos por el número total de bases que lo componen.

De secuencia: los alelos de un mismo locus se diferencian en la base (A, C, G o T) presente en una o más posiciones concretas.

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

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

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

Secuencia repetida en tándem: región de ADN repetitivo constituida por una secuencia determinada que se repite consecutivamente, una detrás de la otra, un número variable de veces. Atendiendo al tamaño de la unidad de repetición, estas secuencia se denominan:

Satélite: unidad de repetición de 1,000 – 10,000 nucleótidos.

Minisatélite: unidad de repetición de 7 – 100 nucleótidos.

Microsatélite: unidad de repetición de 2 a 6 nucleótidos.

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

SNP (Single Nucleotide Polymorphism): polimorfismo de un solo nucleótido

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

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

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

STR: (Short Tandem Repeats): microsatélite.

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

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats): minisatélite.

BIBLIOGRAFÍA.-

- 1.- Revista Proceso. En un solo año se cometieron 2 mil 663 secuestros, denuncia ONG. En: PROCESO [en línea], (2014) www.proceso.com.mx/?p=361996 [citado en 9 de enero de 2014].
- 2.- Bonfil O. Martín. **50** años de la doble hélice, la molécula más bella del mundo. ¿Cómo ves? (No. 53 Abril 2003); 10 – 16.
- 3.- Bonfil O. Martín. La construcción de la doble hélice. De la nucleína al ADN. Revista Ciencias UNAM (No. 71 Septiembre 2003); 4 – 15.
- 4.- Fernández R, Francisco. Análisis de 15 loci tipo Short Tandem Repeat (STR) en la población de Paraguay para su uso en identificación Forense. Granada, 2008. Trabajo de grado (Doctor en Ciencias Biológicas). Universidad de Granada. Depto. de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría.
- 5.- Farfán E. Ma. José. Introducción del ADN Aplicada en el Laboratorio Forense. En: Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Depto. de Sevilla. (Vol. No. Año); 3934 – 3956
- 6.- Lorente A. J. Antonio, Vega N. Ma. Lourdes, Rosas S. G. Oliva. Genética Forense. La Ciencia al Servicio de la Justicia. Mensaje Bioquímico, (Vol. XXXI, 2007); 44 – 67. ISSN-0188-137X
- 7.- La Enciclopedia de la Criminología [Internet]. México: Procuraduría General de la República; c2012 – 2014 [citado 11 Dic. 2013]. Disponible en: <http://wikipediacriminologia.es.tl/>
- 8.- Colegio Mexicano de Ciencias Forenses. Criminalística [en línea] www.mexicoforense.org [citado 20 Noviembre de 2013]
- 9.- Universidad Nacional Autónoma de México. Plan de Estudios Ciencias Forenses [en línea] <www.facmed.unam.mx/fm/cforense> [citado 17 de octubre de 2012].
- 10.- González M. Rafael. Temas de Criminalística. Academia Mexicana de ciencias Penales. México 2005; 175 – 180; ISBN 970-32-910
- 11.- Watson JD. Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature. 1953 171: 737 – 738.
- 12.- Rodríguez C. Cristina. Genética Forense. En: Revista Fuente (Vol. 2 No. 4 Septiembre 2010). 31 – 35. ISSN 2007 - 0713

- 13.- Riaño CO. Capitulo 1 –Historia y Evolución de las Ciencias Forenses. En Tomo I Criminalística de: Enciclopedia de criminalística, criminología e investigación. 2010.
- 14.- La Criminalística. Historia de la criminalística. En: [en línea] < <http://adrybcriminologia.blogspot.mx/> > [citado 15 de diciembre de 2013]
- 15.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [en línea] < <http://www.inegi.org.mx/> > [citado 16 de diciembre de 2013]
- 16.- Carriles H. Karina. Análisis para medir que tan eficaz o ineficaz fue el aumento de la pena en el delito del secuestro. Puebla 2006. Tesis profesional (Licenciatura en Derecho). Universidad de las Américas Puebla. Departamento de Derecho.
- 17.- Besares E. Marco A. El secuestro, Ed. Porrúa, México, 2003, Tercera edición.
- 18.- .-Biblioteca Jurídica Virtual del Instituto de Investigaciones de la UNAM. Base de Datos Criminalísticos en la Procuraduría General de la Republica [en línea] < www.juridicas.unam.mx > [citado 22 Noviembre de 2013].
- 19.- Código Federal Penal. Libro segundo. Título Vigésimoprimer. Privación Ilegal de la Libertad y de otras Garantías. Artículos: 364 – 366. (México 7 de enero de 2014)
- 20.- Ley General para Prevenir y Sancionar los Delitos en Materia de Secuestro, Reglamentaria de la Fracción XXI del artículo 73 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Dirección General de Servicios de Documentación, Información y Datos. [en línea] < <http://www.provictima.gob.mx/> > [citado 17 de diciembre de 2013].
- 21.- Es México Líder Mundial... en Secuestro. Secuestro a la alza. En: Proceso [en línea] 2013 < <http://www.proceso.com.mx/?p=360368> > [citado 10 de diciembre 2013]
- 22.- Lisker Rubén. Ética y genética. Revista Ciencias UNAM. (No. 58 Junio 2000); 26 – 30
- 23.- Poder de justicia del estado de Chiapas. [en línea] <<http://ppje.poderjudicialchiapas.gob.mx/pdfs/C%202001-3.pdf>> [citado 18 de diciembre de 2013]
- 24.- Luque José, Herráez Ángel, Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. España; Ed. Harcourt, 2005.
- 25.- Muños J. Eduardo, López Yamel, Ramírez Hernando. Las Leyes de la Herencia. En: Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. (Vol. 2. No. 1 Marzo 2004); 82 – 92.
- 26.- Velasco M. Reinaldo. La Biología Molecular y el ADN. En: Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. (Vol. 2. No. 1 Marzo 2004); 55 – 60.
- 27.- Chang R. Química. Cuarta edición. McGraw-Hill. México 2000.

- 28.- Budowle B y Brown BL. El uso del análisis de ADN en la identificación forense. *Forensica*. 2001 1: 9 – 23.
- 29.- Butler, John M. *Forensic DNA Typing. Biology, Technology and Genetics of STR Markers*. 2^{da} Ed. New York: ELSEVIER; 2005. 123 - 132
- 30.- Butler John M., Schoske R., Vallone Peter, Kline Margaret, Redd Alan, Hammer Michael. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Science International* (129, USA - 2002) 10 – 24
- 31.- Davis, Geoffrey. *Criminalistics. Analytical Chemistry*, (Vol. 47, No. 3, March 1975).
- 32.- Reynolds R., Sensabaugh G. Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples Using the Polimerasa Chain Reaction. *Analytical Chemistry*, Vol. 63., No. 1, 1991.
- 33.- Frankman S, Kent M and Ryan A. The Y chromosome deletion detection system. *Promega Molecular Diagnostic. Promega Notes* 74: 14 – 17.
- 34.- Martínez espín, Esther. Análisis y Comparación de 16 Loci STR en Cromosoma Y de Varios Grupos Poblacionales (Apellidados Colón y no Apellidados Colón) en la Cuenca Noroeste Mediterránea. Granada, Mayo 2008. Trabajo de grado (Doctor en Ciencias Biológicas). Universidad de Granada Facultad de Medicina Depto. de Medicina Legal.
- 35.- Promega. Power Plex[®] Fusion System [en línea] < www.promega.com/tbs/ > [citado 26 de Dic. de 2013].
- 36.- Mullis Kary B. The Inusual Origen of the Polimerasa Chain Reaction. *Scientific American*, April, 1990.
- 37.- Singh, B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah S and Rahman HA. A genus – and species – specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg*. 199 60:687 – 692.
- 38.- Martha Legorreta H. *Manual de Prácticas para el Laboratorio de Genética Clínica Parte I*. UNAM. (México 2007) 11 – 13 ; 41 – 43 ; 50 – 52; 83 – 86
- 39.- Martha Legorreta H. *Manual de Prácticas para el Laboratorio de Genética Clínica Parte II*. UNAM. (México 2009) 5 - 8 ; 114 – 128
- 40.- PROMEGA. Plexor[®] HY System for the Stratagene Mx3000P^R and Mx3005PTM Quantitative PCR Systems [en línea] < www.promega.com/tbs/ > [citado 26 de Dic de 2013].
- 41.-Butler John M., Buel Eric, Crivellente Federica, McCord Bruce R. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetics analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* (25 USA – 2004) 1397 – 1412.
- 42.- Szalanski L. Allen, James W. Austin, Jackie A. McKern, Dayton Steelman. Isolation and Characterization of Human DNA From Bed Bug, *Cimex lectularius* L., (Hemiptera: Cimicidae)

Blood Meals. En: Department of Entomology, University of Arkansas. (Vol. 23, No.3 2006)
189 – 194

43.- Stores Tracy, Usinger Robert. Zoología General. Ed. Omega; Sexta edición. 2000; 587 – 638.

44.- Cabezas M. Fidel. Introducción a la Entomología. Ed. Trillas. 2000; 90 – 97.

45.- Buserll P. Introducción a la Fisiología de los Insectos. Ed. Alhambra. 1990; 7

46.- Toro G. Haroldo, Chiappa T. Elizabeth. Biología de los Insectos. Ed. Universitarias de Valparaíso. 2003; ISBN 978-956-17-0340-7.

47.- Higuchi R., Blake Edward T. Applications of the Polymerase Chain Reaction in Forensic Science. Tomado de Banbury Report 32: DNA Technology and Forensic Science. Cold's Spring Harbor Laboratory Press, 1989.