



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estandarización de técnicas de extracción de DNA de
cartílago de cadáveres y restos altamente degradados
para el proceso de identificación humana mediante
microsatelites STR's**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

AVILÉS VILLADA DAVID

DIRECTOR DE TESIS:

Biól. María Eugenia Ambriz Franco Romero

2017



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Avilés
Villada
David
55 32 04 78 18
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
309047564

2. Datos del tutor

Biól.
María
Eugenia
Ambriz
Franco Romero

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Claudia
Andrea
Segal
Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Gisele
Olivia
Rosas
Solares

5. Datos del sinodal 3

M. en C. Gen.
Mauro
López
Armenta

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Horacio
Valdemar
Bárceñas
Rodríguez

7. Datos del trabajo escrito

Estandarización de técnicas
de extracción de DNA de
cartílago de cadáveres y restos
altamente degradados para
el proceso de identificación
humana mediante microsatelites
STR's
79 pp
2017

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida y darme la oportunidad de conocer a tantas personas que me han ayudado y que han sido un ejemplo para mí.

Gracias a mis padres Antonio Avilés y María de Lourdes que me han apoyado en todos los aspectos de mi vida y que siempre han estado para mí cuando lo necesito. A mi hermano Antonio le agradezco todos los momentos graciosos que hemos pasado y que me han alejado de las presiones de la escuela, así como sus consejos y su guía a través de los años. A los tres los quiero mucho, y sin ellos, nada de esto sería posible.

Gracias a mi tía Coqui que siempre me ha animado para que me titule y sea alguien en la vida. Le agradezco por cuidarme tantos años y por enseñarme acerca del negocio familiar. Te quiero mucho.

Gracias a mi tíos que me han orientado y animado para llegar a las metas que me he propuesto. A mis primas Ali, Yoyo e Ingrid que siempre nos hemos considerado como hermanos y a mi primo Edi que siempre me alienta a estudiar en el extranjero.

Gracias a Mauro y Maru, no solo por ser los guías de este trabajo, sino también por ser unas grandes personas conmigo al haberme brindado la confianza y su cariño durante mi tiempo en el laboratorio. Muchas gracias por sus consejos de vida, por sus pláticas tan graciosas e interesantes, por todo el conocimiento que han compartido conmigo y sobre todo, por el tiempo que me han dado para explicarme y aclarar mis dudas. No tengo palabras para describir lo mucho que estoy agradecido, solo puedo decirles que los admiro y los quiero mucho, que son un gran ejemplo de vida para mí y espero llegar a ser como ustedes en la vida.

Gracias a Mariana, Yadira y Raúl por todos los momentos divertidos que hemos pasado en el laboratorio y por sus historias tan interesantes que reflejan su gran experiencia en el área forense a lo largo de los años.

Gracias a mis maestros y sinodales, la Dra. Claudia, la Dra. Giselle y el M. en C. Horacio; que me han brindado su conocimiento, sus buenas críticas, comentarios y correcciones acerca de este trabajo.

Gracias a mis amigos de la facultad Carlos, Jorge, Ferri, Mau, Sandi, Itzel, Madison, Carolina y Fernanda por los buenos y graciosos momentos que hemos pasado a lo largo de casi 5 años. Muchas gracias por sus consejos y su amistad. Gracias a Fernanda que por ella conocí e ingresé al laboratorio de genética y a Carolina por su cariño, comprensión y apoyo. A todos los quiero mucho.

Gracias a mis amigos de secundaria Alfonso, Adrián, Pedro, Carlos, Armando y Jorge que siempre hemos estado juntos, nos hemos apoyado y hemos compartido momentos divertidos. Los quiero mucho

Gracias a Renata que ha sido una gran inspiración para mi durante toda la carrera. Te agradezco por todo el amor, cariño, tiempo y apoyo que me has dado. Es indescriptible cada momento que hemos pasado, ha sido muy bonito compartir el mundo contigo y eres una de las personas más especiales en mi vida. Te quiero mucho.

Gracias a la Facultad de Ciencias y la UNAM por dejarme ser parte de su alumnado y formarme como persona y profesionista.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él.”

Louis Pasteur

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
GENÉTICA FORENSE	5
OCCISOS DESCONOCIDOS	6
BASE DE DATOS	7
MARCO TEÓRICO.....	8
DNA	8
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL DNA	8
ESTRUCTURA DEL GENOMA	9
VARIABILIDAD GENÉTICA.....	10
POLIMORFISMOS.....	10
<i>Minisatélites o VNTR's</i>	11
<i>Microsatélites</i>	12
Microsatélites en cromosoma Y.....	14
Microsatélites en el cromosoma X	14
<i>Mini STR's</i>	15
<i>mtDNA</i>	15
<i>SNP's</i>	17
<i>InDel's</i>	17
MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	17
<i>Muestras de referencia</i>	17
<i>Muestras críticas</i>	18
FENÓMENOS CADAVERÍCOS	18
<i>Fenómenos cadavéricos tempranos</i>	19
Acidificación de tejidos.....	19
Enfriamiento cadavérico	19
Deshidratación cadavérica	19
Livideces	19
Rigidez.....	19
Espasmo cadavérico.....	20
<i>Fenómenos cadavéricos tardíos</i>	20
Destruidores	20
Autolisis	20
Putrefacción	21
Fase cromática	21
Fase enfisematosa	22
Fase de la licuefacción	23
Fase de reducción esquelética	24
Conservadores.....	25
Momificación	25
Adipocira (saponificación)	25
Corificación	27
<i>Cadáveres calcinados</i>	27
PROCESOS DE DEGRADACIÓN <i>POST MORTEM</i> EN DNA.....	28
MUESTRAS ÓSEAS	29
CARTÍLAGO	30

<i>Cartílago hialino</i>	30
<i>Cartílago elástico</i>	31
<i>Cartílago fibroso</i>	31
<i>Cartílago en el área forense</i>	31
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE DNA	33
<i>Extracción orgánica fenol:cloroformo:alcohol isoamílico</i>	33
<i>Extracción con sílica</i>	35
CUANTIFICACIÓN DE DNA	36
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	37
<i>PowerPlex® Fusion System</i>	40
ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE DNA	40
<i>Electroforesis capilar</i>	40
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO	45
OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
MÉTODO	46
TOMA DE MUESTRA	46
<i>Cartílagos costales</i>	46
<i>Cartílagos distales</i>	47
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	49
EXTRACCIÓN DE DNA	50
<i>Lisis celular</i>	50
<i>Purificación de DNA</i>	51
Método fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (extracción orgánica).....	51
Método de sílica	51
PCR TIEMPO REAL (CUANTIFICACIÓN)	52
PCR PUNTO FINAL	53
ELECTROFORESIS CAPILAR Y GENOTIPIFICACIÓN,	54
ANÁLISIS DE DATOS	54
RESULTADOS	55
<i>Cuantificación</i>	55
<i>Prueba estadística</i>	57
<i>Perfiles genéticos de cartílagos costales</i>	58
<i>Perfiles genéticos de cartílagos distales</i>	65
<i>Perfiles obtenidos con cada técnica</i>	67
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	71
LITERATURA CITADA	72
ANEXO	79

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Patrón de bandeo resultante entre individuos relacionados. El patrón 9 y 10 son idénticos ya que pertenecen a gemelos monocigóticos, los cuales comparten bandas con su madre (patrón número 8) y su padre (patrón número 11). Los patrones de bandeo 12 y 13 son de individuos no relacionados. En la parte superior se muestra la filogenia. Tomado y modificado de Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S. (1985).....6

Figura 2. El DNA está compuesto de cuatro nucleótidos: Adenina, Timina, Guanina y Citosina. Guanina y Citosina se unen a través de 3 puentes de hidrógeno, mientras que timina y adenina se unen por 2. La unión de ambas cadenas antiparalelas forma una estructura en forma de hélice.....9

Figura 3. Variación a nivel de DNA: Los polimorfismos de secuencia como los SNP's, en los cuales cambia un solo nucleótido en una secuencia en específico; los polimorfismos de secuencia, los cuales se modifica el número de repetidos en una secuencia. Tomado de Butler, J. 2009.....11

Figura 4. Estructura de los microsatélites STR. Los microsatélites utilizados en el área forense son de 4 repetidos y su variabilidad está dada por la diferencia en la longitud de las secuencias. Para un individuo homocigoto la longitud de la secuencia es exactamente la misma, mientras que para un heterocigoto la longitud de la secuencia es diferente y por tanto el número de repetidos. Cada alelo se nombra por el número de repetidos en su secuencia. Tomado de Goodwin, W. 2007.....13

Figura 5. Los 13 marcadores utilizados por CODIS con el fin de identificación humana.....13

Figura 6. Organización de DNA mitocondrial. El DNA circular mitocondrial contiene una región control de aproximadamente 1.1 kb, el cual comprende la región hipervariable 1 y la región hipervariable 2. Tomado de Jobling. *et. al.*, 2004.....16

Figura 7. Fundamento de la cuantificación por PCR en tiempo real. Los primers utilizados en la reacción de PCR contienen una sonda TaqMan que contiene una molécula fluorescente y un Quencher el cual evita que se libere la fluorescencia. Posteriormente cuando se amplifica la DNA polimerasa rompe la sonda y libera ambas promoviendo que se libere la fluorescencia en cada ciclo de extensión. Tomado de Arya, M. *et.al.* 2005.....37

Figura 8. 24 marcadores amplificados en el Power Plex Fusion System. Cada color indica la sonda fluorescente con la que está marcada. El color naranja representa el size estándar y nos refleja el tamaño de los marcadores que se utilizaron en el estudio.....40

Figura 9. Detección de productos amplificables por electroforesis capilar. Los fragmentos de DNA migran a través de un capilar hasta que son interceptados por un láser el cual incide sobre las moléculas fluorescentes. La fluorescencia resultante es captada por una cámara especial y

mandada al software para su análisis. Tomado de Goodwin. W. et. al., 2007.....42

Figura 10. Perfiles genéticos de la muestra 25 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver en estado de putrefacción, específicamente en la fase enfisematosa. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.....58

Figura 11. Perfiles genéticos de la muestra 28 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver en estado de putrefacción, específicamente en la fase de licuefacción. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.....59

Figura 12. Perfiles genéticos de la muestra 18 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida del único cadáver momificado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.....60

Figura 13. Perfiles genéticos de la muestra 23 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver en estado de saponificación. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Se observa degradación en ambos perfiles genéticos, sin embargo son exitosos para identificación.....61

Figura 14. Perfiles genéticos de la muestra 17 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida del único cadáver en estado de corificación. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.....62

Figura 15. Perfiles genéticos de la muestra 17 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver carbonizado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.....63

Figura 16. Perfiles genéticos de la muestra 30 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un resto humano (pie izquierdo). A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Se observa degradación de DNA, sin embargo son perfiles exitosos para identificación.....64

Figura 17. Perfiles genéticos de la muestra 21 con ambos métodos de extracción. Muestras de lajas obtenidas de cadáver carbonizado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Se observa degradación de DNA, sin embargo son perfiles exitosos para identificación.....65

Figura 18. Perfiles genéticos de la muestra 23 con ambos métodos de extracción. Muestras de lajas obtenidas de cadáver saponificado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. No se obtuvo ninguno de los marcadores.....66

IMÁGENES

Imagen 1. Cadáver en fase cromática. Se muestra la red venosa póstuma característica. Tomada de Amendt, J. et.al. 2010.....	22
Imagen 2. Cadáver en fase enfisematosa. Se muestra el desprendimiento de la capa más externa de la piel y el comienzo de la licuefacción en cabeza y parte del pecho.	23
Imagen 3. Cadáver en fase de licuefacción. Se observa la coloración negra característica, así como también los órganos se encuentran altamente degradados por la putrefacción.....	24
Imagen 4. Cadáver en fase de reducción esquelética.....	24
Imagen 5. Único cadáver momificado incluido en el estudio.....	25
Imagen 6. Cadáver en estado de saponificación.....	26
Imagen 7. Cadáver en estado de corificación.....	27
Imagen 8. Ejemplo de un cadáver carbonizado remitido al Instituto de Ciencias Forenses.....	28
Imagen 9. Cartílago costal del individuo momificado.....	46
Imagen 10. Muestra de hueso de pie con cartílago adherido a las paredes. Única muestra de restos humanos.....	46
Imagen 11. Corte de lajas de cartílago de cadáver número 21, el cual estaba carbonizado. En este caso se tomó lajas de cartílago de fémur.....	47
Imagen 12. Resguardo para el transporte de las lajas de cartílago en un tubo estéril de 15 mL.....	47
Imagen 13. Remoción de tejido blando adherido al cartílago con un bisturí. Muestra de cadáver carbonizado.....	49
Imagen 14. Lavado de muestras en agitación magnética en una mezcla de detergente por una noche.....	49

GRÁFICAS

Gráfica 1. Cuantificaciones de cada muestra con ambos métodos. Estandarización con 25 mg de polvo de cartílago.....	55
---	----

TABLAS

Tabla 1. Disciplinas forenses dedicadas a la identificación humana y sus características.....	4
Tabla 2. Muestras obtenidas de cartílago costal y/o distal de los 30 individuos no identificados con su respectivo fenómeno cadavérico.....	48
Tabla 3. Cuantificación de DNA obtenido con ambos métodos de extracción. Estandarización con 50 mg de polvo de cartílago y una elución final de 35 μ L de agua.....	50
Tabla 4. Cantidades en μ L de reactivos del kit Power Plex Fusion® para una reacción de PCR con un volumen final de 25 μ L.....	52
Tabla 5. Curva de preparación de estándares de DNA control. Se realiza las diluciones correspondientes para ajustar la concentración de la curva.....	53
Tabla 6. Reactivos y volumen en μ L utilizados para una reacción de PCR, con un volumen final de 25 μ L.....	53
Tabla 7. Condiciones de termociclado para una reacción de PCR con el kit Power Plex Fusion® a 28 ciclos.....	54
Tabla 8. Reactivos y cantidades (en μ L) utilizados por muestra en un ensayo de electroforesis capilar.....	54
Tabla 9. Cuantificaciones de cada muestra con ambos métodos. Estandarización con 25 mg de polvo de cartílago.....	56
Tabla 10. Cantidad de DNA obtenido en ng/ μ L. de las 5 muestras de cartílagos distales con 12.5 mg.....	56
Tabla 11. Prueba estadística realizada para el estudio con un nivel de significancia de .05 y el valor P correspondiente.....	57
Tabla 12. Resultados del número de perfiles obtenidos y no obtenidos con cada técnica.....	67

Resumen

La identificación humana es una tarea multidisciplinaria en donde áreas como la dactiloscopia, antropología y odontología trabajan en conjunto detallando rasgos particulares de cadáveres en calidad de desconocidos. Sin embargo, la identificación se complica cuando estos cadáveres o restos humanos presentan un estado avanzado de putrefacción eliminando características o marcas con las que puede ser identificado como huellas dactilares, cicatrices, tatuajes o algún otro elemento susceptible de ser reconocido, limitando las alternativas para la identificación. En tales circunstancias, las pruebas de DNA son preponderantes ya que permiten individualizar muestras biológicas aún en pequeñas cantidades y en algunos casos con estado de degradación severo. En cadáveres putrefactos la viabilidad de tejido blando es nula debido a la degradación que también sufre el material genético, en tales circunstancias los restos óseos resultan ser la alternativa como fuente de DNA, sin embargo, los procedimientos de extracción de material óseo pueden tardar semanas e incluso meses obteniéndose en algunas casos, un bajo rendimiento en la recuperación de DNA. Uno de los recursos poco considerados como fuente de DNA es el cartílago, es por eso que su uso puede ser una fuente alternativa para la obtención de DNA en cadáveres en estado avanzado de putrefacción, ya que presenta características que le permiten soportar condiciones adversas en las que pudieron haber estado sometidos los cadáveres.

Debido a lo variable que puede ser el estado de descomposición de un cadáver, la cantidad de DNA recuperado fluctúa ampliamente, en consecuencia es necesario estandarizar las técnicas utilizadas en cada tipo de muestra para así obtener resultados de manera rápida, confiable y eficaz que permitan realizar una posible identificación o aportar elementos en una investigación, dentro de éstas se incluyen por su bajo costo la extracción de DNA orgánica o fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y sílica. Por las consideraciones anteriores, el presente trabajo propone estandarizar, comparar e implementar ambas técnicas de extracción de DNA en muestras de cartílago tomadas de cadáveres putrefactos y restos altamente degradados, para determinar cuál proporciona mejores resultados en cuanto a la concentración de DNA, así como en la generación de perfiles genéticos.

Se tomaron treinta muestras de cartílago costal y cinco muestras de cartílago de porción distal de huesos largos de cadáveres con fenómenos tardíos y tardíos conservadores como licuefacción, enfisematoso, saponificación, corificación, momificación, calcinación, así como en restos humanos degradados, cada una fue procesada con las técnicas de extracción de DNA de fenol:cloroformo:alcohol

isoamílico y sílica, la concentración de DNA se determinó mediante PCR tiempo real, se amplificaron las muestras por PCR punto final con el sistema genético PowerPlex® Fusion que contiene 24 microsatélites STR's, finalmente mediante electroforesis capilar se generaron los perfiles genéticos correspondientes.

Se obtuvieron con ambas técnicas de extracción 29 perfiles genéticos a partir de cartílago costal de cadáveres y uno de un resto correspondiente a una extremidad en un estado altamente degradado, por otra parte de las 4 muestras de cartílago distal, en una no fue posible generar el perfil genético correspondiente.

Se compararon los promedios de los valores de cuantificación de DNA obtenidos con ambos métodos de extracción mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney. El valor P obtenido ($P=.1958$) indica que no existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de DNA utilizando ambos métodos de extracción. En conclusión, el cartílago es una alternativa viable para la obtención de DNA, los dos métodos de extracción evaluados pueden ser empleados indistintamente para el análisis de muestras de cartílago recabados de cadáveres en avanzado estado de putrefacción o restos degradados y por consiguiente para obtener perfiles genéticos. El potencial que tiene el cartílago como muestra para obtención de DNA es reducir tiempos de respuesta en casos en donde el uso de tejido óseo parecía la única alternativa, las técnicas de extracción valoradas son de costos reducidos y de fácil acceso en laboratorios con recursos limitados, lo cual abre una nueva posibilidad en el análisis de muestras altamente degradadas.

Introducción

La unidad estructural y funcional básica de la vida es la célula. En promedio, cada ser humano está compuesto de aproximadamente 100 trillones de células que se originan a partir de un cigoto formado por la unión de una célula espermática y un óvulo. Cada célula de nuestro cuerpo contiene la misma información genética, dentro del núcleo se encuentra el DNA que contiene el código informacional para la duplicación celular y la formación de proteínas necesarias para las funciones básicas de un organismo. El DNA se encuentra compactado en estructuras denominadas cromosomas dentro del núcleo, además existe DNA extranuclear conocido como DNA mitocondrial (Buttler, 2009; Bhanwer, A. *et. al.*, 2001).

La información genética de cada individuo es única y ésta a su vez es transmitida a siguientes generaciones, siendo la genética la ciencia que se encarga del estudio de la herencia, es decir, describe cómo es que se transmiten los genes de un individuo a otro. Además se encarga de estudiar la naturaleza de los genes transmitidos describiendo los mecanismos de expresión y regulación génica; analiza cómo y qué tan frecuentes son en una población y cómo van cambiando a lo largo de las generaciones, elucidando una gran parte de la evolución biológica.

La genética ha revolucionado las ciencias forenses de tal manera que actualmente es una herramienta fundamental para la identificación humana, análisis de evidencias e identificación de especies entre otras. Es posible analizar con gran precisión y rapidez marcadores genéticos que son variables en cada individuo permitiendo obtener un perfil genético y comparar si dos muestras que aparentemente son distintas provienen de un mismo individuo por lo que es posible llevar a cabo pruebas de identificación humana así como también establecer relaciones de parentesco biológico.

La genética forense se ha involucrado en sucesos importantes de identificación humana alrededor del mundo, por ejemplo, en desastres masivos como el atentado del *World Trade Center* del 11 de septiembre del año 2001, en la identificación de víctimas del tsunami asiático en 2004, en el análisis de restos óseos encontrados en fosas clandestinas producto de conflictos armados y narcotráfico, así como en la identificación de víctimas del incidente en Waco, Texas.

El trabajo de un genetista dentro del área forense dependerá de la infraestructura y recursos de cada laboratorio, lo que permitirá el análisis de todo tipo de material biológico con una gran variedad de métodos de extracción que se adecúen perfectamente a las muestras procesadas con gran éxito. Cada procedimiento de extracción tiene un impacto significativo en la sensibilidad y la reproducibilidad de cada prueba forense determinando así su efectividad, su óptimo rendimiento y un

aspecto muy importante que es su bajo costo; aplicando cada método experimental para que pueda ser reproducible en cualquier laboratorio que maneje muestras con un alto grado de descomposición.

Tabla 1. Disciplinas forenses dedicadas a la identificación humana

Métodos de identificación	Características
Antropología	<ul style="list-style-type: none"> -Generación de un perfil biológico que indica características como estatura, edad, sexo y afinidad con grupos étnicos. -Descripción de características esqueléticas como fracturas, enfermedades, implantes y anormalidades. -Determinación de sexo. Se analizan centros de osificación en huesos así como huesos de cadera y pelvis entre otros. -Determinación de altura mediante el análisis de huesos largos como fémur, utilizando fórmulas matemáticas. -El análisis de cada muestra es comparada con tablas de medidas y características que se tienen en la población, permitiendo un aproximado a los rasgos físicos de la persona (Stanojevich, V. et al., 2012) -La pérdida de material óseo limita la identificación
Odontología Forense	<ul style="list-style-type: none"> -Procesamiento, revisión, evaluación de evidencia dental generando información objetiva en un proceso legal. -Identificación mediante la comparación de registros dentales <i>ante mortem</i> y <i>post mortem</i>. -Identificación con marcas odontológicas como tratamientos de endodoncias, coronas, puentes, estudios radiológicos y prótesis dentales. -Análisis dental puede dar una estimación de edad y de sexo. La mineralización y desgaste dental es un buen estimador cronológico. -La falta de un registro <i>ante mortem</i> con el cual comparar las características de un cadáver es una desventaja. -La pérdida de material dental por las condiciones de muerte limita la identificación odontológica (Ata-Ali, J., et al. 2014). -La ventaja del material dental es que puede perdurar muchos años gracias a sus constituyentes minerales.
Dactiloscopia	<ul style="list-style-type: none"> -Huellas dactilares son patrones únicos formados por crestas y surcos en dedos de las manos y en los pies. -Identificación se basa en reconocer la presencia y ausencia de características a lo largo del patrón de crestas y su secuencia (Yoon, S. 2014). -La desventaja de este método es que no se puede obtener un patrón de huella por la ausencia de manos y pies en cadáveres que provengan sin extremidades superiores e inferiores, además del desprendimiento epidérmico general y/o en individuos sin registros de huellas <i>ante mortem</i>.

Genética forense

La genética forense es una especialidad de las ciencias forenses que se ocupa del estudio de la herencia biológica, a través del análisis de la variabilidad presente en el DNA, aplicada a la resolución de problemas de orden legal. Gracias a los avances tecnológicos el análisis de DNA ha revolucionado las ciencias forenses de tal manera que actualmente se ha convertido en una herramienta indispensable para las investigaciones proporcionando información necesaria para poder precisar con un alto grado de certeza la relación biológica que puede existir entre dos o más personas, o bien entre la evidencia encontrada en la escena del crimen y la víctima o probable infractor. Debido a que en cada organismo está presente esta molécula y que presenta variabilidad entre especies, cualquier material biológico puede ser asociado con un caso legal (Jobling. *et. al.*, 2004; Kayser, M. 2011).

El uso de DNA en el ámbito forense fue introducido en el año de 1985 por el genetista británico Alec Jeffreys, quien se enfocó en análisis de ciertas regiones polimórficas llamadas minisatélites, y que eran altamente variables entre individuos. Al observar que los patrones de bandeo que resultaban del análisis de los minisatélites eran únicos para cada individuo, como analogía a las huellas dactilares, las pruebas de DNA tomaron el nombre de *DNA fingerprint* o huella genética (Jeffreys, A. *et. al.*, 1985).

Al comparar los patrones de bandeo con individuos relacionados revelaron que algunos fragmentos se compartían, lo que potenció su uso para identificación y pruebas de parentesco (Figura 1) (Jeffreys, A. *et. al.*, 1985). En 1986 se presentó el primer caso legal de DNA forense en el cual dos niñas habían sido abusadas sexualmente y posteriormente asesinadas, teniendo ambas muertes características similares cerca de una villa en Leicestershire, Inglaterra. La primer prueba de DNA forense en una corte excluyó al sospechoso Richard Buckland de haber cometido el asesinato, sin embargo, se encontró que concordaba con un hombre llamado Colin Pitchfork quien había evadido la prueba, persuadiendo a su amigo para que diera una muestra por el (Roewer, L. 2013). Estos estudios sentaron las bases de lo que hoy se conoce como tipificación de DNA y la identificación humana. Desde el descubrimiento de los minisatélites se han desarrollado nuevos sistemas de tipificación de DNA altamente informativos, actualmente, con el uso de marcadores como los microsátélites y nuevas tecnologías como electroforesis capilar, así como amplificación por PCR permiten llevar a cabo estudios con mayor precisión y rapidez.

El análisis de DNA se ha convertido en un método estándar en todos los laboratorios forenses, principalmente en casos criminales y de identificación humana (Carracedo, A. 2005).

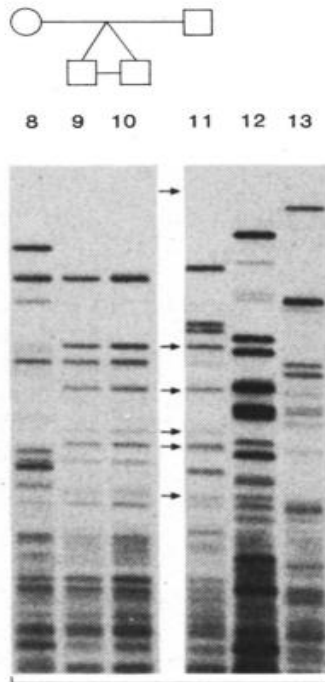


Figura. 1. Patrón de bandeo resultante entre individuos relacionados. El patrón 9 y 10 son idénticos ya que pertenecen a gemelos monocigóticos, los cuales comparten bandas con su madre (patrón número 8) y su padre (patrón número 11). Los patrones de bandeo 12 y 13 son de individuos no relacionados. En la parte superior se muestra la filogenia. Tomado y modificado de Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S. (1985).

La genética forense involucra el análisis de material biológico que se recupera en escenas de crimen con el objetivo de proporcionar información acerca de casos como asesinatos, violaciones, robos, desapariciones, entre otros. Las pruebas para determinar relaciones biológicas de parentesco son útiles en caso de demandas de reconocimiento o desconocimiento de paternidad y que actualmente son altamente solicitados. De igual manera se analiza distintas muestras biológicas como cabello, sangre, semen, restos óseos, saliva, tejido blando con el objetivo de esclarecer la identidad de cadáveres en calidad de desconocidos, al comparar los perfiles genéticos obtenidos con los perfiles de los familiares que solicitan la prueba.

Cabe señalar que el procesamiento de cada una de los indicios biológicos dependerá del material e infraestructura del laboratorio forense, lo cual permitirá el potencial uso de distintas muestras para lograr el objetivo necesario (Goodwin, W. *et. al.*, 2007).

Occisos desconocidos

Un occiso es aquella persona que ha sido asesinada o que ha muerto de una manera violenta. El término occiso proviene del verbo latín *occedere* que significa matar.

El destino de estos cuerpos no identificados es la fosa común, mientras que otros son enviados a universidades para su estudio y disección. Cabe mencionar que

los individuos que son mandados a universidades son cadáveres completos y en buen estado donde se someten a métodos de conservación, siendo los cadáveres con un alto grado de descomposición y algunos en buen estado los que son enviados a la fosa. En promedio 700 cadáveres al año son enviados a la fosa común. La mayoría de estas personas mueren por causas naturales, otros fallecen por hechos de tránsito, homicidios, suicidios, accidentes, entre otras causas. En 2015 el total de cadáveres ingresados al INCIFO fue de 4936, de los cuales 680 no fueron identificados.

Base de datos

Una base de datos en genética forense constituye una importante fuente de investigación en los nuevos sistemas criminales de justicia, ya que contiene los perfiles genéticos de sospechosos criminales y de víctimas, con el fin de proporcionar información en casos relevantes permitiendo realizar comparaciones entre estos perfiles genéticos. Una base de datos permite establecer posibles vínculos entre un sospechoso con algún delito específico esclareciendo crímenes que no han sido resueltos, por lo que es posible identificar sospechosos acelerando el proceso de las investigaciones (Santos. *et. al.*, 2013). Una base de datos también aporta información para identificar personas que se encuentran desaparecidas, comparando los perfiles de familiares con los perfiles genéticos obtenidos de cadáveres desconocidos. La primera base de datos de DNA en el mundo fue creada en Inglaterra en 1995 y hasta la actualidad contiene perfiles genéticos con microsatélites de aproximadamente 2.4 millones de individuos, de los cuales más de 200 mil provienen de escenas de crimen (Levitt, M. 2007). CODIS (*Combined DNA Index System*) es una de las bases de datos más importantes en la actualidad desarrollada por el FBI (*Federal Bureau of Investigation*) está integrada por perfiles genéticos de evidencias, delincuentes, detenidos, cadáveres y restos humanos no identificados. Hasta diciembre de 2016 cuenta con más de 12, 689,529 perfiles de delincuentes, 2,583,427 perfiles de detenidos y 750,217 perfiles relacionados con casos forenses y con toda esta información han logrado realizar 359,077 coincidencias y auxiliado en más de 344,194 investigaciones.

En México no existe una base de datos nacional consolidada formalmente, a pesar de que se anunció su formación en 2014. Sin embargo en cada laboratorio forense de los diferentes estados de la República contienen un banco de datos de perfiles genéticos obtenidos de evidencias, delincuentes, cadáveres y restos desconocidos, así como de familiares que buscan a personas desaparecidas.

Marco teórico

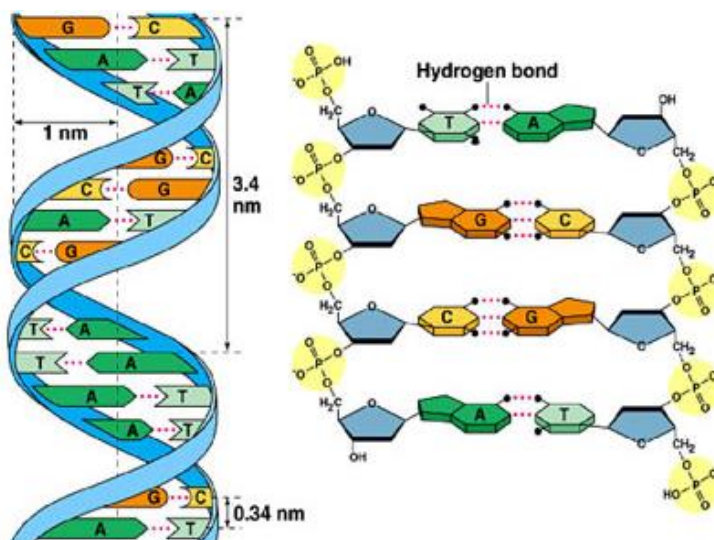
DNA

El ácido desoxirribonucleico o DNA es la biomolécula que almacena toda la información necesaria para llevar a cabo todos los procesos para sustentar la vida. La replicación de esta información asegura su continuidad genética de una generación a otra y es crítica para el desarrollo normal de un individuo. El DNA se encuentra en el núcleo de cada una de nuestras células (excepto glóbulos rojos debido a que carecen de núcleo por su función) y se encuentra organizada en unidades hereditarias conocidas como genes que determinan las características físicas y otros atributos. El DNA completo dentro una célula se le conoce como genoma. En 1953 por Watson y Crick describieron no solo la estructura del DNA sino aportaron conocimiento para determinar cómo la información se replica y cómo contiene las instrucciones para producir proteínas (Alberts, B. et.al. 2015; Lodish, Butler, J. 2009).

Estructura y función del DNA

Los ácidos nucleicos incluido el DNA están compuestos de nucleótidos, los cuales están formados por tres componentes característicos: una base nitrogenada, una pentosa y un fosfato. Las bases nitrogenadas son de dos tipos púricas: adenina y guanina y pirimídicas: citosina y timina. Las cadenas de nucleótidos están formadas por la unión de bases nitrogenadas gracias la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre ellas dándole estabilidad a la cadena. Siempre una purina se unirá con una pirimidina, por lo que la adenina se unirá con timina por medio de dos puentes de hidrógeno, mientras que citosina y guanina se unirán por medio de 3 puentes de hidrógeno. El DNA tiene diferentes características: ambas cadenas corren en antiparalelo, es decir, sus enlaces 5'-3' corren en direcciones opuestas y ambas cadenas no son idénticas ni en secuencia ni en composición de bases, en cambio, son complementarias entre sí como previamente se describió, lo que permite elucidar a partir de una cadena, el contenido de nucleótidos que presenta la cadena complementaria (Figura 2). La naturaleza de esta estructura permite que la información sea replicada debido a que cada hebra de DNA al ser complementarias, es molde o templado para la síntesis de una nueva hebra de DNA, asegurando una réplica exacta del material genético.

Figura 2. El DNA está compuesto de cuatro nucleótidos: adenina, timina, guanina y citosina. Guanina y citosina interactúan a través de 3 enlaces por puente de hidrógeno, mientras que timina y adenina se unen por 2. La interacción de ambas cadenas antiparalelas forma una estructura en forma de hélice.



Estructura del genoma

El genoma humano consta de dos partes: el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. El DNA nuclear se encuentra dividido en cromosomas, las cuales son estructuras formadas por una molécula de DNA lineal junto con proteínas que lo empaquetan y lo compactan denominadas histonas (Alberts, B. et.al. 2015; Strachan, T. et.al. 2004). En humanos cada célula contiene un total de 23 pares de cromosomas, 22 autosomas y un par son cromosomas sexuales: X y Y (los cuales determinan el género: XX para mujeres y XY en hombres). Las células somáticas contienen dos juegos de cromosomas, uno heredado de línea paterna y el otro por línea materna dando un total de 46 cromosomas lo que genera un estado diploide celular. Las células haploides solo contienen un juego de cromosomas, como el óvulo y espermatozoide. Un par de cromosomas al ser idénticos en estructura, función y que contienen los mismos genes se les denomina cromátidas hermanas. El lugar físico o posición de un gen dentro de un cromosoma se denomina locus (Primorac, D. et. al. 2014).

El análisis del genoma humano reveló que su tamaño es de aproximadamente 3 mil millones de pares de bases, de los cuales se cree que sólo el 1.5% pertenece al DNA codificante, mientras que el 98.5% restante del genoma corresponde al DNA no codificante. El DNA codificante o exones son segmentos de DNA que llevan la información para la secuencia de aminoácidos de una proteína y de igual manera regulan la expresión de estos genes, mientras que el DNA no codificante o también denominado como intrones son segmentos de DNA repetitivos que interrumpen entre los segmentos codificantes (Alberts, B. et.al. 2015; Goodwin, W. et. al., 2007). Dentro del DNA extragénico o no codificante aproximadamente 30% consiste en secuencias repetitivas que se dividen en dos clases: secuencias

repetidas en tándem y elementos interespaciados. La mayoría de los sistemas de genotipificación forense están basados en las secuencias repetitivas del DNA, las cuales también se les conoce como DNA satélite (Carracedo, A. 2005)

Variabilidad genética

El objetivo de la genética forense es identificar el perfil de un individuo, el cual es único y por tanto pueda ser altamente discriminatorio, permitiendo que los estudios de genética tengan un alto nivel de confiabilidad. Como especie somos muy similares a nivel genético, ya que compartimos entre el 99.7 y 99.9 % de nuestro genoma, por lo tanto la variación genética entre las personas es de 0.1 a 0.3%, siendo ésta la información que se analiza en el área forense (Wright, A. 2005; Goodwin, W. *et. al.*, 2007). La variación dentro del DNA se presenta en la forma de diferentes alelos, los cuales son las variantes o las formas alternativas de un gen en un locus en particular. En una célula diploide cada gen tiene dos alelos que ocupan el mismo locus en un cromosoma homólogo ya que un alelo es de origen paterno y el otro de origen materno (Rodríguez, R. 2009). Cuando el genotipo contiene alelos que son idénticos en un locus en particular se le denomina como homocigoto, mientras que un individuo al tener dos diferentes alelos en un locus en particular en un cromosoma homólogo se le denomina como heterocigoto.

La variación genética resulta mayormente de las mutaciones durante la replicación del DNA, sin embargo, dentro del DNA codificante la mayoría de veces se corrigen ya que estos genes deben seguir manteniendo la misma función. Por el contrario dentro del DNA no codificante al no estar relacionado con un producto funcional exhibe mutaciones que se mantienen y pasan a la siguiente generación (Carracedo, A. 2005)

Las regiones variables dentro del DNA se denominan como polimorfismos, los cuales son los marcadores que proveen la información necesaria para producir un perfil genético único con el fin de identificación. La diferencia en la secuencia y en los repetidos de los polimorfismos es lo que individualiza genéticamente a una persona (Robertson, J. 2002)

Polimorfismos

Los polimorfismos se definen como una secuencia variante que se presenta con una frecuencia de al menos 1% de una población. Existen dos formas de variación dentro de una población a nivel de DNA: polimorfismos de secuencia y polimorfismos de longitud (Butler, J. 2009) (Figura 3). Los SNP's (*single nucleotide polymorphism*) son marcadores utilizados también en genética forense los cuales son polimorfismos de secuencia ya que en estos se presenta un cambio o una sustitución de una base por otra, mientras que los polimorfismos de longitud como

los VNTR's (*variable number of tandem repeats*) se modifica el número de nucleótidos repetidos a lo largo de una secuencia.

Estos polimorfismos dentro del área forense se denominan marcadores, los cuales se definen como segmentos de DNA con una localización física conocida dentro de un cromosoma, que sirven para identificación de especies o individuos rastreando el patrón hereditario de un gen, y pueden ser utilizados incluso para conocer la relación entre una enfermedad y su origen genético.

Las secuencias utilizadas dentro de la genética forense deben tener estas características: ser altamente polimórficos (altamente variables entre individuos), ser fácilmente genotipificados, dar resultados fácilmente interpretables y comparables entre distintos laboratorios, no estar bajo presión de selección y tener un bajo rango de mutación. (Goodwin, W. *et. al.*, 2007)

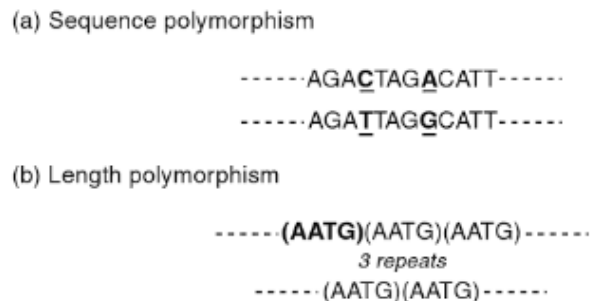


Figura 3. Variación a nivel de DNA: Los polimorfismos de secuencia como los SNP's, en los cuales cambia un solo nucleótido en una secuencia en específico; los polimorfismos de secuencia varía el número de repetidos en una secuencia. Tomado de Butler, J. 2009

Minisatélites o VNTR's

Son regiones las cuales están formadas por repeticiones en tándem de 6 hasta 100 pares de bases, llegando a medir desde 500 pares de bases hasta varias kilobases. Fueron los primeros marcadores altamente polimórficos utilizados para estudios de parentesco y de identificación humana (Vergnaud, G. 2000). La detección simultánea de estos segmentos se realizó por medio de la técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (por sus siglas en inglés RFLP's) el cual consistía en cortar estas regiones en fragmentos por medio de una enzima de restricción, separarlos por un gel de agarosa y finalmente hibridarlo por medio de sondas específicas en un *Southern blot* obteniendo un patrón de bandeo específico para cada individuo (Jeffreys, A. 1985; Butler, J. 2009). La combinación de distintos VNTR producía una alta discriminación entre individuos, sin embargo, su análisis y la técnica de RFLP's tenía varias limitaciones entre las cuales se encuentra el tamaño grande de estos segmentos (hasta mil pares de bases) y la

degradación de los mismos en muestras forenses donde la recuperación de DNA es mínima, además de que se requería una gran cantidad de muestra para obtener cerca de 50 ng de DNA y analizar estos marcadores. Estas desventajas hicieron que los VNTR fueran reemplazados por los microsatélites (Carey, L. *et. al.* 2002; Knight, J. 2009)

Microsatélites

También conocidos como *Short Tandem Repeats* (STR's), son actualmente los marcadores más utilizados dentro del área de la genética forense en todo el mundo reemplazando a los minisatélites. Son secuencias de DNA que contienen unidades repetidas de 2 a 6 pares de bases, encontrándose distribuidas a lo largo del genoma incluido en los cromosomas sexuales. Se han popularizado ya que son fácilmente amplificables por medio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y a su vez con la introducción de nuevas tecnologías como la electroforesis capilar automatizada y PCR multiplex fue posible hacer la detección sencilla y rápida de estos fragmentos (Butler, J. 2009).

El tamaño de estos marcadores es de 50 a 500 pares de bases, lo que permite analizar fragmentos relativamente pequeños de DNA y por tanto, muestras que se encuentran altamente degradadas y en mínimas cantidades. Existen distintos tipos de microsatélites que se dividen por el número de repetidos, de los cuales podemos encontrar di, tri, tetra, penta y hexanucleótidos, siendo los segmentos que tienen 4 repetidos los más utilizados en genética forense porque generan una menor cantidad de artefactos, facilitando la interpretaciones de los perfiles genéticos (Fan. *et. al.* 2007; Willems, T., *et. al.* 2014). Existen un gran número de microsatélites pero en el área forense actualmente se analizan más de 20 al mismo tiempo.

La variación dentro de los microsatélites está dada por la longitud de la secuencia y el número de repetidos altamente polimórficos al poseer muchas variantes alélicas y altamente discriminatorios generando como consecuencia, perfiles genéticos únicos con los cuales es posible realizar confrontas y establecer relaciones de parentesco (Figura 4). El tamaño de los microsatélites los hace un mejor candidato para muestras forenses donde la degradación de DNA es el mayor problema. Otra ventaja de estos marcadores es su baja tasa de mutación que ronda entre los 10^{-3} - 10^{-5} nucleótidos por generación haciéndolos muy estables a lo largo de las generaciones.

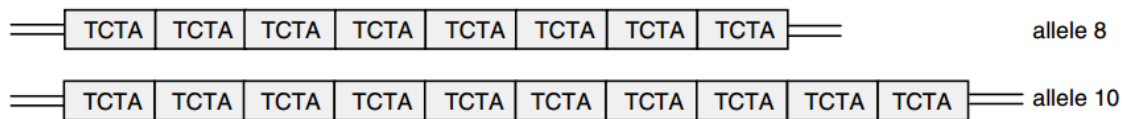


Figura 4. Estructura de los microsatélites STR. Los microsatélites utilizados en el área forense son de 4 repetidos y su variabilidad está dada por la diferencia en la longitud de las secuencias. Para un individuo homocigoto la longitud de la secuencia es exactamente la misma, mientras que para un heterocigoto la longitud de la secuencia de cada alelo es diferente y por tanto el número de repetidos. Cada alelo se nombra por el número de repetidos en su secuencia. Tomado de Goodwin, W. 2007.

Hasta hace unos años se utilizaban 13 marcadores de tipo STR seleccionados por el CODIS para realizar estudios de identificación humana (Figura 5), siendo este el número mínimo de marcadores para establecer una posible relación de parentesco, sin embargo, al generarse perfiles incompletos con una menor cantidad de marcadores obtenidos dada las condiciones de degradación de las muestras forenses, daba pie a generar falsos positivos a la hora de confrontar dos perfiles genéticos, lo que resultó en aumentar el número de marcadores para poder discriminar con mayor precisión dos diferentes perfiles genéticos (Bluter, J. 2006).

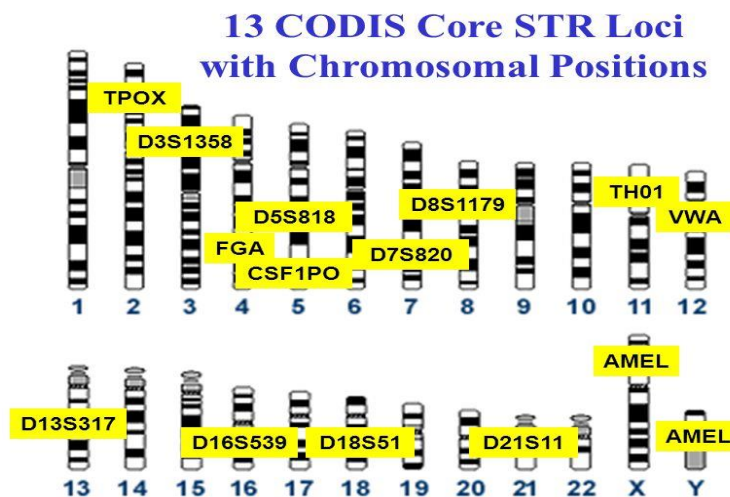


Figura 5. Los 13 marcadores utilizados por CODIS con el fin de identificación humana.

Los microsatélites se nombran por su localización en el cromosoma o por el nombre del gen al cual están asociados. Por ejemplo TPOX se encuentra dentro del gen de la peroxidasa tiroidea. Los STR que no están asociados a genes se

designan por su posición en el cromosoma: para el marcador D3S1358 la letra D es por DNA, el número 3 por el número del cromosoma en donde se encuentra, la letra S de “single copy” significa que no se encuentra en otro cromosoma y el número 1358 es el locus donde se encuentra este marcador en el cromosoma indicado (Chen, K. 2012).

Desde el año 2000 las compañías Promega y Applied Biosystems se han encargado de desarrollar kits comerciales de sets de marcadores STR para amplificar desde los 13 hasta los 24 que se utilizaron en este estudio, todos en una misma reacción de PCR. Además de los marcadores STR se agrega el locus de amelogenina que está presente en los cromosomas X y Y. El gen de amelogenina codifica para una proteína que conforma el esmalte dental y dentro del cromosoma X tiene una delección de 6 pares de bases haciendo que durante su amplificación se formen productos, algunos de 106 pares de bases del cromosoma X y 112 pares de bases del cromosoma Y, aunque el tamaño del fragmento puede variar según el diseño de sus oligonucleótidos, y que en cualquier caso permite diferenciándolos (Goodwin. W. *et. al.*, 2007).

Microsatélites en cromosoma Y

Los STR en cromosoma Y han sido utilizados en el área forense para identificación de individuos de sexo masculino en casos de paternidad y estudios evolutivos. Estos marcadores son heredados vía paterna y no están sujetos a recombinación por lo que a lo largo de las generaciones la aparición de los marcadores se mantiene sin ningún cambio aparente. (Kayser, M. *et.al.* 2000)

El análisis de estos marcadores es de gran importancia en casos donde es necesario caracterizar DNA masculino en material proveniente de casos de abuso sexual o violaciones. Ello implica el análisis de muestras mezcladas de origen masculino y femenino, siendo estos marcadores útiles cuando es difícil separar los diferentes tipos celulares de la víctima y el infractor o cuando la cantidad de muestra del perpetrador se encuentra en mínimas cantidades comparado con las de la víctima. Los perfiles genéticos obtenidos con STR autosómico en casos de violación son difíciles de evaluar dado que hay una mezcla de células, por lo que el estudio con microsatélites en cromosoma Y puede llegar a ser mucho más específico (Wurm-Schwark. *et. al.* 2003; Hammer, M. *et.al* 2005)

Microsatélites en el cromosoma X

Estos STR's son reconocidos como una herramienta adicional para el análisis de marcadores en pruebas de parentesco complejas. Tienen un patrón de herencia particular: las mujeres son dicigóticas, mientras que los hombres hemicigóticos (una sola copia de cromosoma) lo que hace que se puedan utilizar en casos de parentesco en las cuales está ausente la parte paterna y donde se pueda

establecer relaciones biológicas con mujeres, dado que no hay alelos que se hereden por descendencia en una relación padre-hijo (Diegoli, T. *et. al.* 2015; Filho, A. *et.al* 2013).

Mini STR's

Las muestras biológicas altamente degradadas por diversos factores contienen un DNA fragmentado, produciendo perfiles genéticos con una cantidad menor de marcadores que pueden generar falsos positivos en confrontas. Es por esto que se ha reducido el tamaño de algunos marcadores STR de la base de datos de CODIS y por ende el tamaño de los productos de PCR disminuyó favoreciendo su análisis y aumentando la probabilidad de tipificar muestras con DNA fragmentado. Estos loci se han utilizado en muestras de tejido preservadas en bloques de parafina y en muestras óseas recuperadas de fosas, pretendiendo complementar los loci de STR autosomales de mayor tamaño en pares de bases para generar un perfil genético de mayor confiabilidad (Coble, M. *et.al.* 2005; Mulero, J. *et.al.* 2008; Constantines, C. *et.al* 2012).

mtDNA

La mitocondria es un organelo que contiene genoma extracelular separado y distinto del genoma nuclear. Su DNA es una doble cadena circular sin proteínas asociadas que codifica para 13 polipeptidos involucrados en la fosforilación oxidativa, además de codificar dos RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia. La región no codificante se denomina como región control de aproximadamente 1, 100 pares de bases. Cada mitocondria contiene entre 2 a 10 copias de DNA mitocondrial y por cada célula puede haber hasta 1000 mitocondrias, dependiendo del requerimiento energético que cada tejido requiera (Budowle, B. *et.al.* 2003; Schon, E. *et.al* 2012). El tejido nervioso y muscular tienen una mayor cantidad de mitocondrias.

Dentro de la región control existen dos segmentos que son variables entre individuos y se conocen como regiones hipervariables 1 y 2. La región hipervariable comprende desde la posición 16024 hasta la 16365 y la región hipervariable 2 desde la posición 73 hasta la 340 aproximadamente (Figura 6).

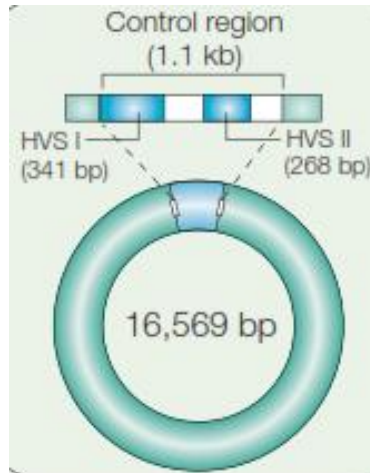


Figura 6. Organización del DNA mitocondrial. El DNA circular mitocondrial contiene una región control de aproximadamente 1.1 kb, la cual comprende la región hipervariable 1 y la región hipervariable 2. Tomado de Jobling. *et. al.*, 2004

El DNA mitocondrial es analizado cuando las muestras forenses están muy degradadas o cuando ya no es posible encontrar DNA nuclear, como en restos antiguos, muestras de cabello y restos óseos generalmente, siendo la última opción de marcadores para identificación.

La ventaja de su análisis en la identificación humana es que gracias a su herencia vía materna en donde no hay recombinación, por lo que es posible determinar relaciones de parentesco con toda la línea materna, además de que la cantidad de DNA siempre será mucho mayor que la de DNA nuclear. La desventaja es que el poder de discriminación del DNA mitocondrial es limitado comparado con los STR's autosómicos, determinándose el tipo de haplogrupo y haplotipo para cada individuo que comparte con todas los integrantes de la misma línea materna. El haplotipo es un conjunto de alelos o variantes que se heredan de manera conjunta a la siguiente generación, mientras que el haplogrupo es un conjunto de haplotipos que han servido para trazar el origen de las poblaciones a lo largo de la historia y definir ascendencia (Witas, H. et.al. 2004).

El manejo del DNA mitocondrial requiere de muchas precauciones, ya que al haber tantas copias es posible que pueda ser considerado como una fuente potencial de contaminación. Además de que no todos los laboratorios forenses cuentan con la tecnología o los recursos para llevar a cabo estos estudios, limitando su análisis (Melton, T. et.al. 2012)

SNP's

Los SNP's representan la clase de polimorfismos más abundantes con más de 5 millones en todo el genoma humano. La degradación es la principal causa del uso de estos marcadores en muestras forenses, ya que sólo se necesita un cambio en una sola base en vez de usar un set de marcadores de hasta 500 pares de bases como los STR. Su tasa de mutación es aún más baja que los STR's con 10^{-8} nucleótidos por generación, lo que en teoría los hace mucho más estable en términos de herencia y con los cuales también es posible llevar a cabo pruebas de identificación (Bluter, J. et.al 2007). A pesar de esto, presentan algunas desventajas: al ser marcadores bialélicos son menos informativos que los análisis con STR's por lo que para tener un mismo poder de discriminación de un set de 13 marcadores STR's, es necesario utilizar de 40 a 60 SNP y para genotipificar una gran batería de SNP se requiere de una cantidad mayor de DNA, aumentando el costo para su análisis. Además, al analizar un gran número de loci es problemático la interpretación de resultados en situaciones que involucran mezclas o múltiples donadores en una muestra. Las químicas de PCR para la detección de los SNP's no están bien estandarizadas y sin un consenso de estos marcadores difícilmente podrán sustituir a los microsatélites STR's (Sobrino, B. et.al. 2005; Budowle, B. et.al 2008).

InDel's

Los Polimorfismos de inserción-delección son marcadores bialélicos que se originan por efecto de una simple mutación, están en todo el genoma humano aproximadamente cada 7.2 kilobases. Su rango de baja de mutación los hace candidatos perfectos para casos forenses en el caso de muestras degradadas y estudios de paternidad. El tamaño de los amplicones utilizados es de 50 a 150 pares de bases, además de que pueden ser analizados con la misma tecnología que los STR's, requiriendo concentraciones bajas de DNA para obtener perfiles genéticos. Actualmente se están generando las frecuencias alélicas de estos marcadores para determinar el poder de discriminación entre dos muestras tomadas al azar en una población con el objetivo de que un futuro sean utilizados para identificación humana (Zidkova, A. et.al 2013).

Muestras biológicas

Muestras de referencia

Las muestras de referencia son las evidencias biológicas cuyo origen es conocido y con las cuales se pueden comparar con cualquier otro tipo de muestra para determinar un parentesco o compararlas con muestras encontradas en una escena de crimen. La sangre, saliva y cabello obtenidos de algún individuo sirven como muestras de referencia, ya sea de personas vivas o de cadáveres. La sangre es colocada en un papel FTA que permite el resguardo de la muestra,

mientras que la toma de saliva implica que se arrastren células del epitelio bucal por medio de un hisopo. Otra característica de estas muestras es que contienen una gran cantidad de DNA y son fácilmente analizadas, desde los métodos de extracción hasta la obtención de un perfil genético.

Muestras críticas

Las muestras críticas son muestras cuya cantidad y calidad de DNA es baja. Este tipo de muestras generalmente están expuestas a diferentes ambientes y contaminantes, provocando que el DNA se encuentre degradado, lo que dificulta su análisis. Muestras como tejido blando (en especial piel o tejidos con una gran cantidad de lípidos), fluidos biológicos como semen (depositados en cualquier superficie en la que haya entrado en contacto como ropa o combinado con muestras de epitelio vaginal, rectal o anal), manchas de sangre, tejido óseo, uñas, colillas de cigarro, cepillos de dientes, goma de mascar, tejidos embebidos en parafina, dientes, muestras de interés arqueológico o muestras antiguas, son un ejemplo de muestras críticas.

Fenómenos cadavéricos

Inmediatamente después de la muerte suceden cambios físico-químicos en un cadáver que van desde la rigidez del cuerpo hasta la total desintegración del mismo, quedando finalmente restos óseos. Estos procesos se denominan fenómenos cadavéricos y son de particular interés para determinar el intervalo *post mortem*, es decir, el tiempo que ocurre entre la muerte y el descubrimiento del cadáver. Ello es fundamental y de gran importancia en investigaciones forenses, ya que provee una referencia temporal de cuándo y cómo pudo haber ocurrido un suceso delictivo.

Los fenómenos cadavéricos son modificaciones que son provocadas no solo por los cambios dentro del cuerpo, sino también por las condiciones ambientales que a su vez aceleran o retardan la descomposición de los cadáveres. Condiciones como altas temperaturas, humedad, la composición del suelo donde se depositaron cadáveres, exposición a fuego, inmersión en agua (dulce, salada o drenajes), radicales libres, radiación solar y fauna cadavérica, son factores determinantes que modulan la degradación y pueden afectar en el análisis de los marcadores desde los procedimientos de extracción hasta amplificación de DNA retardando el proceso de identificación (Donaldson, A. et.al. 2013; Sales, A. et.al. 2006)

La descomposición puede variar dentro de un mismo individuo, con algunas partes del cuerpo mostrando fenómenos cadavéricos distintos: por ejemplo las extremidades superiores e inferiores de un cuerpo pueden estar momificados

mientras que la parte del abdomen está en proceso de corificación (Pinheiro, J. et.al. 2006).

La descomposición es un proceso continuo y se puede dividir en distintas etapas pese a su similitud, dependiendo del autor.

Fenómenos cadavéricos tempranos

Acidificación de tejidos

Todo el metabolismo se detiene, además del conjunto de oxidaciones orgánicas en el cuerpo, lo que provoca una acumulación de metabolitos dentro de las células y por consecuencia los tejidos se acidifican. Esto es a lo que se le denomina signo seguro de muerte ya que impide la revitalización del tejido, siendo el tejido nervioso el primer afectado.

Enfriamiento cadavérico

Al detenerse el metabolismo por la falta de oxígeno la temperatura del cuerpo comienza a descender hasta igualar la temperatura del ambiente. Al enfriamiento cadavérico también se le denomina *Algor Mortis*, y ocurre en un periodo de 18 a 20 horas, perdiendo un grado centígrado en las primeras 3 horas y después de eso 1 grado cada hora (Amendt, J. et.al. 2010; Sales, A. et.al. 2006)

Deshidratación cadavérica

Se refiere a la pérdida de agua por evaporación. Esto trae consigo cambios externos como pérdida de tono muscular, así como también la muerte de células de la córnea con una mancha característica la cual se denomina Signo de Sommer comenzando la opacidad ocular.

Livideces

También denominado *Livor Mortis* o como hipostasis. Es un proceso físico que ocurre después de que el corazón se detiene, por gravedad comienza a descender la sangre hacia las partes inferiores del cuerpo, dependiendo la posición en la que se encuentre. Esto resulta en la decoloración de la parte donde se acumuló la sangre. Esto ocurre después de 1 a 2 horas de la muerte y concluye 3 a 4 horas después, dando la información de la posición en la que una persona falleció (Amendt, J. et.al. 2010).

Rigidez

Cambio químico resultado del endurecimiento y retracción de los músculos que ocurre dentro de 1 a 3 horas después de la muerte y finaliza a las 15 horas posteriores. Producida por la degradación de ATP a AMP hasta un 15% y la acumulación de ácido láctico proveniente de glucógeno que acidifica el pH celular, provocando que los componentes principales del músculo que son actina y

miosina formen puentes químicos entre sí, resultando en el endurecimiento de las fibras musculares lo que se le conoce como rigidez cadavérica.

Este cambio comienza en músculos pequeños de la cara y miembros superiores hasta finalmente el abdomen y miembros inferiores desapareciendo en el mismo orden a las 24 horas cuando ya las proteínas musculares se desnaturalizan y no puede mantener la contracción física. Su desaparición coincide con la aparición de una mancha verde en el abdomen indicando el inicio de la putrefacción.

Espasmo cadavérico

Rigidez instantánea después de la muerte que fija al individuo en la posición o postura que tenía en el momento de morir. Se observa en traumatismos o cuando inesperadamente ocurre la muerte en plena actividad muscular, ya que se ha consumido el glucógeno lo que produce la rigidez mucho antes que el *Rigor Mortis*.

Fenómenos cadavéricos tardíos

Destrucción

Autólisis

Proceso en el cual progresivamente se destruyen los tejidos por acción de enzimas hidrolíticas celulares sin la intervención bacteriana. Este proceso irreversible marca el comienzo de la degradación y reducción del cadáver. Cada tejido tiene diferente ritmo de descomposición, por la diferencia en la cantidad enzimática, en este sentido el hígado es uno de los órganos principales que se descompone más rápido con un gran contenido de enzimas altamente catabólicas, mientras que el músculo puede degradarse a un ritmo más lento.

Algunas enzimas que contienen los organelos conocidos lisosomas son proteasas, lipasas, glucosidasas y nucleasas, mientras que los peroxisomas contienen catalasas y oxidasas (Shulze, H.et.al. 2009).

La necrosis celular hace que los organelos pierdan su estructura, haciendo que se liberen iones que mantienen el pH en ambos organelos acidificando el citosol aumentando la actividad catalítica de las enzimas y comenzando a degradar y a causar daños en todos los componentes intracelulares, incluyendo organelos, uniones celulares que mantenían la integridad estructural en los tejidos, membranas y biomoléculas impactando en la viabilidad celular y en la degradación de DNA (Rich, J. et.al. 2005). A este nivel la degradación por autólisis solo es posible observarlo a nivel histológico.

Putrefacción

El desarrollo de un ambiente anaeróbico, con bajos niveles de pH y rico en todo tipo de nutrientes o biomoléculas es el resultado de la autólisis. Dentro de este ambiente las células del sistema de defensa dejan de funcionar, permitiendo que la proliferación de microorganismos oportunistas e invasivos pueda extenderse rápidamente. La putrefacción es el proceso de la descomposición de materia orgánica del cadáver por acción de bacterias. El crecimiento acelerado de los microorganismos y su metabolismo generan productos inorgánicos y destrucción profunda de los tejidos resultando en cambios visibles en el cadáver como cambio de color, producción de gases y un olor característico (Rich, J. et.al. 2005). Otros productos que se forman son dióxido de carbono, metano, cadaverina, putrescina y compuestos fenólicos que generan que el cadáver se infle por la acumulación de gases.

La putrefacción comienza en órganos donde la cantidad de bacterias es considerablemente grande, siendo los intestinos y el estómago los primeros afectados, posteriormente afecta extremidades superiores e inferiores.

La etapa de putrefacción cuenta con tres fases:

Fase cromática.

Uno de los primeros signos de putrefacción es la decoloración de la pared abdominal baja, en la fosa iliaca, la cual es producida por la unión de gas sulfuro de hidrógeno (H_2S) con hemoglobina formando un complejo denominado sulfohemoglobina, produciendo una mancha de color verde que posteriormente se extiende hacia abdomen y torax (García, J. 2015; Pinheiro, J. et.al. 2006; Amendt, J. et.al. 2010)

Este signo de putrefacción es producido de 24 a 36 horas después de la muerte, dependiendo de cada cadáver y la cantidad de microorganismos presentes (Rich, J. et.al. 2005)

Se presenta otro fenómeno denominado red venosa póstuma, la cual resulta de la colonización del sistema venoso por microorganismos que se encargan de hemolizar la sangre. Este fenómeno aparece principalmente en abdomen, pecho y hombros, primeramente con un color rojizo hasta una tonalidad verde 4 días posteriores a la muerte.



Imagen 1. Cadáver en fase cromática. Se muestra la red venosa póstuma característica. Tomada de Amendt, J. et.al. 2010.

Fase enfisematosa

La producción de gases por las bacterias hace que todos los tejidos se hinchen y el cadáver se infla como consecuencia, acumulando la mayor cantidad de gases en la región abdominal. Aunado a esto, la parte más externa de la piel comienza a desprenderse. La acción enzimática provoca que la capa externa de la piel se disgregue y por tanto se separa de la dermis a tal punto que es posible removerla por completo. La ruptura del tejido epidérmico puede aumentar el ritmo de descomposición ya que se abren nuevos sitios donde nuevos microorganismos y fauna cadavérica pueden tener fácil acceso (Amendt, J. *et.al.* 2010).

Durante la fase enfisematosa los gases producidos comienzan a provocar la descomposición de los tejidos, necrosándolos y tornándolos a un color verdoso-café hasta una coloración gris-negra en la siguiente etapa de la putrefacción.



Imagen 2. Cadáver en fase enfisematosa. Se muestra el desprendimiento de la capa más externa de la piel y el comienzo de la licuefacción en cabeza y parte del pecho.

Fase de la licuefacción

Se acelera la reproducción bacteriana dado al ambiente anóxico dentro del cadáver. Los aminoácidos del músculo son fácilmente convertidos en ácidos grasos, mientras que también son producidos compuestos fenólicos y glicerol durante el metabolismo bacteriano (Vass, A. 2001).

La pérdida estructural de los órganos es notoria en todo el organismo: las glándulas suprarrenales, páncreas, bazo, hígado y riñones se licúan rápidamente formando líquido espeso denominado putrúlagos que es el resultado de la desintegración de todos los tejidos. Los gases previamente producidos se liberan por cavidades y a través de la parte más externa de la piel lo que produce el olor característico. (García, J. 2015)

Durante esta etapa la piel comienza a cambiar a una coloración negra y los órganos restantes más resistentes como los pulmones, próstata y útero se convierten simplemente en sacos de coloración café que contienen materia orgánica en descomposición. La desintegración de los tejidos dependerá de la cantidad de tejido conjuntivo y la cantidad de músculo que contenga. Además es común la presencia de larvas de insectos del orden Coleoptera y Diptera que en estadios previos se depositaron y en esta etapa incrementan en gran número. Para el final de la fase de licuefacción (a las 3 semanas) las larvas habrán removido gran parte de la piel residual del cadáver (Pinheiro, J. et.al. 2006).



Imagen 3. Cadáver en fase de licuefacción. Se observa la coloración negra característica, así como también los órganos se encuentran altamente degradados por la putrefacción.

Fase de reducción esquelética

El cadáver es reducido a huesos y tejido resistente a la degradación como cartílago y cabello. Durante esta etapa es común la migración de larvas del orden Diptera, las cuales son reemplazadas por especies del género Coleoptera como un patrón de sucesión faunística. Puede ocurrir entre 3 a 5 años en promedio hasta avanzar a la pulverización de los restos óseos (Amendt, J. et.al. 2010).



Imagen 4. Cadáver en fase de reducción esquelética.

Conservadores

Momificación

Es un proceso natural de conservación que consiste en la desecación que ocurre en los tejidos del cadáver, el cual es producido por un ambiente seco con altas temperaturas y baja humedad. La evaporación rápida de los tejidos y las temperaturas no permiten la proliferación de microorganismos, impidiendo que continúe la putrefacción (García, J. 2015)

En el proceso de momificación la pérdida de peso del cadáver es considerable en el cadáver, disminuyendo su volumen, dejando la piel con una apariencia dura, acartonada con una coloración entre café y negro. La momificación también puede preservar órganos internos, dependiendo de la autólisis y putrefacción que haya presentado el cadáver. El proceso de momificación puede llevar de 6 meses hasta 1 año dependiendo las condiciones ambientales y puede conservar el cadáver por años y hasta siglos.



Imagen 5. Único cadáver momificado incluido en el estudio.

Adipocira (saponificación)

Es el proceso de conservación cadavérica en la cual se forma una capa de grasa en el tejido adiposo y muscular. Su nombre proviene de las palabras latinas adipo” que significa grasa y “cira” que significa cera o también se le conoce con el nombre de saponificación (García, J. 2015) La adipocira es generado por la

alteración de tejido blando del cadáver en una sustancia tipo cera de coloración gris-blanca y amarilla que posteriormente se convierte en una masa dura y resistente. Los cuerpos expuestos al calor y en ambientes húmedos generan este tipo de conservación (Gupta, M. et.al 2011).

Los procesos de hidrólisis e hidrogenación de ácidos grasos como triglicéridos en glicerina y ácidos grasos libres penetran los tejidos incluyendo piel y músculos. El metabolismo bacteriano lleva a la transformación de ácidos grasos en presencia de agua, combinándose con iones calcio y amonio; produciendo que el punto de fusión de los metabolitos aumente y los ácidos grasos cristalicen formando una sustancia jabonosa que rodea a los tejidos. Otros factores que producen la saponificación son la insuficiente circulación de gases, privación de oxígeno, acidez, presencia de sales (por el depósito de iones calcio, magnesio y sodio) y otros metabolitos que afectan el pH. El agua es esencial para la formación de adipocira ya que remueve la glicerina y promueve la actividad enzimática involucrada en la descomposición de grasas (Fiedler, S. et.al. 2003; Gupta, M. et.al 2011)

Dependiendo de la cantidad de tejido adiposo del cadáver dependerá en cuanto tiempo se puede formar la sustancia tipo cera, ya que se puede requerir de 6 meses hasta 1 año. Eventualmente la degradación de todas las grasas llevará a la esqueletización, sin embargo, la conservación de cadáveres puede ser de hasta más de 100 años (Ubelaker, D. et.al. 2011)



Imagen 6. Cadáver en estado de saponificación.

Corificación

Es el fenómeno en el cual la piel del cadáver tiene un aspecto de cuero con una coloración entre amarilla y café. Es considerada como una etapa previa a la momificación, ya que ha comenzado el proceso de deshidratación, sin embargo todavía los tejidos contienen una cantidad considerable de líquidos para diferenciar entre ambos fenómenos cadavéricos. La piel tiene una consistencia dura, sin embargo es posible que aún contenga una ligera flexibilidad por los escasos líquidos presentes en los tejidos. Para la deshidratación se necesitan las mismas condiciones que la momificación, por lo que se puede considerar para su formación entre 6 meses a 1 año (García, J. 2015).



Imagen 7. Cadáver en estado de corificación.

Cadáveres calcinados

Se presentan en individuos que han estado expuestos a elevadas temperaturas y no pueden ser reconocidos por las alteraciones tan grandes que el fuego ha causado a nivel de tejido, partes blandas y hueso. Alteraciones como la retracción y destrucción de tejidos, desaparición de pelo, coloración negra en la piel son comunes en individuos carbonizados. Dependiendo el grado de carbonización puede afectar distintas partes del cuerpo como tórax, abdomen o zonas en donde el foco de incendio actuó, mientras otras partes pueden encontrarse intactas. (Sánchez, J. et.al. 2009)

A temperaturas de 200 a 300⁰C comienza la afectación del hueso por pérdida de agua, hasta los 400 ⁰C comienza la combustión de la materia inorgánica del tejido

óseo, resistiendo temperaturas de hasta 800⁰C. El DNA es estable a temperaturas menores a 100⁰C y se ha reportado que la degradación de DNA ocurre a una temperatura aproximada de 190⁰C, sin embargo, se ha obtenido DNA de pulpa dental de individuos que han estado expuestos a temperaturas de hasta 300⁰C (Karni, M. et.al. 2013; Ubelaker, D. 2008).



Imagen 8. Ejemplo de un cadáver carbonizado remitido al Instituto de Ciencias Forenses.

Procesos de degradación *post mortem* en DNA

La necrosis genera un patrón al azar de degradación de DNA. Primeramente las proteasas degradan las histonas que mantienen la cromatina unida liberan el DNA y posteriormente las nucleasas endógenas inician el proceso de fragmentación en el periodo *post mortem*. Enzimas dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺ producen fragmentos de alto peso molecular, mientras que enzimas como DNasa II se encarga de producir fragmentos de bajo peso molecular. Moléculas producidas por bacterias como putrescina se encargan de romper la cadena en presencia de purinas. De igual manera las especies reactivas de oxígeno y peróxido de hidrógeno producido por el metabolismo aeróbico de los microorganismos que colonizan el tejido *post mortem* pueden modificar las pirimidinas en los residuos de azúcar y además remover bases o pueden causar un “crosslinking” entre las hebras de DNA. De igual manera la radiación puede modificar de la misma manera que las especies reactivas del oxígeno, con la particularidad de que pueden formar dímeros principalmente en los residuos de timina (Aleaddini. *et. al.* 2010).

Muestras óseas

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo especializado con componentes celulares y no celulares. La parte celular está compuesta por osteocitos, osteoclastos y matriz extracelular (principalmente colágeno), mientras que la parte no celular está formada por un componente inorgánico mineral denominado hidroxiapatita que incluye fósforo cálcico, carbonato de calcio, fluoruro de calcio, hidróxido de calcio y citrato; el componente inorgánico ocupa cerca del 70% del hueso. Los componentes inorgánicos del hueso hacen que este tejido sea altamente resistente a condiciones ambientales extremas como altas temperaturas y humedad, por lo que han sido útiles en estudios de ancestría, filogenias y de identificación de restos humanos antiguos (Deaton, S. 2015; Loreille, O. et.al 2007).

La identificación humana con restos óseos no solo implica el análisis de DNA nuclear, sino también de DNA mitocondrial. En el caso en que las muestras estén altamente degradadas y el análisis de STR's genere perfiles incompletos es posible obtener gran cantidad de DNA mitocondrial; ello es característico de muestras antiguas.

Existen casos en los cuales no es posible acceder a otro tipo de muestra que no sean restos óseos. Como se mencionó anteriormente, durante la descomposición cadavérica, la putrefacción en estado enfisematoso no permite que los tejidos blandos puedan utilizarse para producir un perfil genético debido a la degradación de DNA. Por tanto, los huesos son la última y única alternativa para poder realizar pruebas de identificación humana permitiendo preservar el DNA por un tiempo prolongado. Sin embargo, existen muchas limitantes para el procesamiento de estas muestras:

La principal limitante de la extracción de DNA de huesos es la degradación por factores ambientales, es decir, las condiciones de suelo en las que se encontró por exposición a ácidos húmicos y fúmicos en muestras de fosas o de desastres en masa, que inhiben la técnica de PCR.

Alguna desventaja del uso de hueso es que requiere de una gran cantidad de muestra para obtener perfiles completos. Generalmente se utilizan desde 0.5 a 2 gramos para obtener un perfil genético, aunque nuevos procedimientos requieren de cantidades de hasta 0.05 gramos (Loreille, O. et.al 2007; Wurm-Schwark, N. et.al. 2008; Ye, J. et.al. 2004; Jakubowska, J. et.al 2012).

Los métodos de extracción de DNA en huesos son comúnmente extracción orgánica fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación etanólica,

desafortunadamente ambos métodos de extracción copurifican inhibidores como sales y fenoles.

Cartílago

El cartílago es un tejido conectivo especializado avascular y desprovisto de nervios compuesto por células llamadas condrocitos y condroblastos, con una matriz extracelular abundante que abarca hasta el 95% de todo el tejido. La matriz extracelular del cartílago es sólida pero también presenta cierta elasticidad. Al no recibir nutrientes directamente de torrente sanguíneo la supervivencia del tejido depende de la matriz extracelular, la cual está compuesta por proteínas especializadas que permiten la difusión de sustancias entre el tejido conjuntivo circundante y los vasos sanguíneos, así como también de fluido sinovial lo que mantiene la viabilidad del tejido (Ross, M. et.al 2006).

La función del cartílago es proveer una estructura flexible para tejidos suaves, estabilizar y ser precursor de hueso durante el desarrollo humano y finalmente fungir como una estructura que permite el movimiento, absorbiendo el impacto de las articulaciones, evitando la fricción y descomposición del hueso.

La matriz extracelular del cartílago consiste en 70% de agua mientras que lo restante está compuesto de distintas proteínas como colágeno tipo I, II, VI, IX, X y XI; proteoglicanos como agregan, ácido hialurónico y finalmente proteínas específicas de cartílago como la proteína oligomérica de matriz y fibromodulina. (Bolton, S. 2014; Bolton, S.et.al. 2015; Roughley, P. 2006).

El cartílago se puede encontrar en distintas partes dentro del cuerpo y se clasifica de acuerdo a las características de su matriz extracelular en 3: cartílago hialino, elástico y fibroso.

Cartílago hialino

Su nombre proviene del griego “*hyalos*” que significa vidrio, describiendo la apariencia traslúcida o transparente del tejido. Dentro del cartílago hialino se encuentran los condroplastos que son espacios grandes de matriz extracelular rodeando de 2 a 4 condrocitos .El cartílago hialino está compuesto principalmente por fibras de colágeno tipo II, glicosaminoglicanos como anexina y proteoglicanos como ácido hialurónico (Welsch, U. 2006).

El cartílago hialino está asociado con el sistema esquelético:

-Forma los cartílagos articulares y costales, cubriendo la superficie de los huesos minimizando la fricción y permitiendo que los huesos se deslicen, manteniendo contacto con el fluido sinovial que se encarga de mantener hidratado al tejido durante los movimientos de contracción y extensión.

-El cartílago hialino es el que se encuentra en una mayor proporción en el cuerpo, encontrándose en sitios como de unión articular, además de laringe, tráquea y nariz.

Cartílago elástico

Similar al cartílago hialino en cuanto a composición, sin embargo, se denomina así dado que posee redes de fibras elásticas interconectadas formando una red que le proporciona una gran flexibilidad y maleabilidad a los sitios anatómicos donde se encuentra (Estrada, E. et.al. 2002).

El cartílago elástico se puede encontrar en la epiglotis de la laringe, en el pabellón auricular y en la trompa auditiva.

Cartílago fibroso

Este tipo de cartílago también está asociado a sistema esquelético, formando parte de los discos intervertebrales, sínfisis pública y en tendones como en meniscos y articulaciones de la mano. El cartílago funge como un amortiguador y es necesario en sitios donde debe soportar grandes fuerzas de compresión y distensión (Estrada, E. et.al. 2002; Ross, M. et.al 2006).

Cartílago en el área forense

El uso de cartílago en el área de la genética forense radica en que debido al estado avanzado de putrefacción de los cadáveres, lo que implica que el DNA en los tejidos blandos no puedan ser utilizado y tomando en cuenta la dificultad del procesamiento de extracción de DNA de huesos y dientes. El cartílago puede ser una fuente alternativa de DNA en casos forenses donde es importante obtener una cantidad de DNA suficiente para generar perfiles genéticos completos, así como también obtener DNA de buena calidad con alto peso molecular de hasta 500 pares de bases o mínimo de 250 pares de bases.

El cartílago es una muestra idónea en genética forense por varias razones:

1. La densidad celular es muy baja en este tipo de tejido, lo que retarda el proceso de autólisis o degradación con respecto a fluidos y tejidos blandos (Rogers, C. et.al 2011).
2. Todas las proteínas que se encuentran dentro de la matriz extracelular sirven como una barrera física que protege a las células y al DNA de la degradación por enzimas exógenas. Además previene de la contaminación causada por suelos o ambientes no favorables y permite que el tejido soporte condiciones extremas como altas temperaturas, exposición a rayos ultravioleta y humedad (Gino, S. et.al 2003).

3. Al estar desprovisto de vasos sanguíneos, los condrocitos están menos propensos a la degradación por microorganismos, como ocurre en la aparición de la red póstuma venosa (Gino, S. et.al 2003).
4. Los condrocitos son capaces de sobrevivir a condiciones de hipoxia, cambiando a un metabolismo anaerobio, permitiéndoles sobrevivir por un cierto tiempo después de la muerte.
5. Los condrocitos se localizan dentro de los condroplastos y rodeados de fibras de colágeno, lo que permite aumentar su viabilidad (Bolton, S. 2014)
6. El estar situado en sitios anatómicos particularmente cerrados dentro del cuerpo, el cartílago se protege contra factores ambientales y degradación permitiendo que la viabilidad del tejido sea aún mayor.
7. La cantidad de agua dentro del cartílago se mantiene constante al menos después de 42 días *post mortem* pese a la degradación manteniendo intacta la estructura del tejido. Esto se debe a que los glicosaminoglicanos forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua manteniendo la estructura original del cartílago (Bolton, S. 2014).

No se conoce a fondo cómo es que ocurre la degradación *post mortem* del tejido cartilaginoso. A pesar de esto se sabe que las metaloproteasas son las primeras enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular. La pérdida de los proteoglucanos y glicosaminoglicanos incrementa la porosidad y la permeabilidad de la matriz extracelular, alterando la matriz de colágena. La degradación de los proteoglicanos puede ser facilitada por un ambiente húmedo, debido a la porosidad de la matriz extracelular, que permite que grandes cantidades de agua se introduzcan dentro del tejido, transportando microorganismos y enzimas proteolíticas reduciendo a las proteínas de bajo peso molecular. La viabilidad celular del cartílago se prolonga hasta 35 días *post mortem* en temperaturas de 2.5⁰C y hasta 14 días *post mortem* a una temperatura de 15⁰C en ensayos con tejido cartilaginoso porcino y bovino. En cartílago humano se ha podido aislar DNA en cadáveres exhumados después de 7 meses (Rogers, C. et.al. 2011; Gino, S. et.al 2003).

El cartílago se ha propuesto como un elemento para conocer el intervalo *post mortem* de cadáveres por medio del análisis la degradación progresiva de proteoglicanos y glicosaminoglicanos, correlacionándolos con factores como tipos de suelo, diferentes temperaturas y ambientes. Utilizando modelos animales, se han extrapolado los resultados a restos humanos con el fin de tener una herramienta molecular mucho más precisa y exacta para determinar el intervalo *post mortem* (Bolton, S.et.al. 2015).

Métodos de extracción de DNA

El éxito de un estudio de DNA depende de varios factores: la elección adecuada de la muestra es de gran importancia siempre y cuando se tenga esa posibilidad y el método de extracción, el cual siempre tendrá como objetivo recuperar la mayor cantidad de DNA.

Un método de extracción y purificación es un procedimiento de biología molecular que sirve para separar todos los componentes celulares irrelevantes tales como membranas y proteínas, con el fin de aislar solamente el material genético. Dependiendo de la muestra biológica, se pueden utilizar distintos métodos de extracción que se adecúan a ésta de acuerdo a sus características; dentro de la genética forense existe una gran batería de métodos de extracción, ya sea para muestras de referencia las cuales pueden procesarse fácilmente, o para muestras altamente degradadas en las cuales es difícil obtener una cantidad de DNA significativa y que también pueden presentar inhibidores de PCR. En muestras degradadas se deben utilizar métodos de extracción que reduzcan la pérdida de DNA y esto se logra reduciendo los pasos durante el procedimiento e introduciendo métodos muchos más específicos en cuanto a unión a DNA.

Los procedimientos de extracción se dividen en dos categorías: métodos sin afinidad a DNA y con afinidad a DNA. Los métodos sin afinidad a DNA remueven todos los materiales dejando al DNA en una solución, sin embargo, algunos inhibidores u otros contaminantes pueden copurificar dentro de esta solución. Métodos como fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, precipitación etanólica y son algunos de los ejemplos. Los métodos con afinidad a DNA tienen una especificidad tal que solamente aíslan el DNA uniéndose a éste por carga. Estos métodos de unión a DNA son preferentemente utilizados en muestras degradadas porque el procedimiento contiene una menor cantidad de pasos y además es tan específico que no copurifica contaminantes o inhibidores de PCR, a menos que la cantidad de contaminantes sea tan grande que impida estéricamente la unión con el DNA. Métodos como sílica y resinas magnéticas son un ejemplo de métodos con afinidad a DNA (Cattaneo, C.et.al. 2006).

A pesar de existir muchos métodos de extracción, algunos con múltiples variables, sólo se referirán los métodos empleados en la presente investigación, los cuales a continuación se citan.

Extracción orgánica fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

La extracción orgánica es el método de extracción más utilizado no solo en laboratorios de genética forense, sino en laboratorios de biología molecular debido a su bajo costo y su uso generalizado en diversas muestras.

El fundamento de la extracción orgánica se basa en el principio de polaridad que se define como la diferencia de carga que existe en una molécula debido a que en un átomo es mayor la densidad electrónica en torno a otro, lo que genera que un extremo de la molécula sea relativamente negativo y el otro relativamente positivo generando dos polos o lo que se denomina molécula polar o hidrofílica. Un ejemplo de una molécula polar es el agua, al contener átomos de hidrógeno con carga parcial positiva y oxígeno con carga parcial negativa, mientras que los hidrocarburos son moléculas no polares o hidrofóbicas. Esta propiedad permite la interacción entre diferentes moléculas con polaridades semejantes como el etanol que es miscible en agua, mientras que los lípidos no interactúan con moléculas polares. De igual manera existen moléculas con una polaridad intermedia, ya que no son miscibles en agua por lo que no se consideran como totalmente polares como el acetato de etilo.

Las proteínas contienen una gran variedad de aminoácidos en su secuencia que pueden ser polares o no polares. Entre los aminoácidos polares se encuentra la lisina, arginina, glutamato e histidina, mientras que los no polares puede encontrarse triptófano, fenilalanina, tirosina, entre otros. La combinación de estos aminoácidos para la formación de una proteína hace que esta contenga regiones o dominios con cargas distintas. Al plegarse las proteínas en medio acuoso dentro de la célula los dominios con carga negativa se encuentran en el núcleo de las proteínas cubiertos por las regiones polares. Al entrar en contacto las regiones hidrofóbicas con el fenol inmediatamente las proteínas pierden su estructura, desnaturalizándose. La hidrofobicidad del fenol también le permite interactuar con lípidos y carbohidratos (Tan, S. et.al 2009; Nelson, D. et.al. 2009).

El cloroformo y el alcohol isoamílico también entran en contacto con proteínas y polisacáridos afines para separarlos del material genético. El alcohol isoamílico también tiene el objetivo de evitar la producción de espuma y favorecer la separación de ambas fases, orgánica y acuosa. Al adicionar los tres componentes al lisado celular, el fenol por densidad formará la fase inferior (fase orgánica) y se formará una fase superior (fase acuosa). La carga del DNA es polar, por lo que se mantendrá en la fase acuosa de la mezcla.

Posteriormente la centrifugación permitirá la separación definida de ambas fases, por lo que cuidadosamente se debe remover la fase acuosa para adicionarlo a un nuevo tubo. Después el DNA se concentra por medio de una precipitación alcohólica, la cual se realiza generalmente con etanol. Generalmente el DNA se precipita con etanol o isopropanol en presencia de una cantidad significativa de sales (acetato de sodio, acetato de amonio, cloruro de sodio, etc.). Algunos alcoholes como el etanol, al entrar en contacto con las sales, favorece la interacción de iones positivos como el sodio para que se unan directamente al

esqueleto con carga negativa del DNA, lo que beneficia su precipitación. El DNA interactúa con el etanol y puede precipitar sin presencia de sales, por lo que en el procedimiento utilizado en este estudio no se adicionó ninguna sal, ya que esto puede resultar en un paso adicional a la extracción en el cual es posible perder DNA durante la eliminación del exceso de dicha sal (Carracedo, A. 2005).

El etanol también funge como una solución que interacciona con componentes de polaridad afín limpiando y removiendo componentes celulares o remanentes que quedaron dentro de la fase acuosa, como restos de cloroformo y fenol. El isopropanol también es utilizado para precipitar DNA al tener una menor polaridad que el etanol. A pesar de que se necesita una menor cantidad de isopropanol para precipitar DNA, se puede copurificar una mayor cantidad de sales ya que son menos solubles en isopropanol, además de que es menos volátil que el etanol requiriendo un mayor tiempo para removerlo. Es por esta razón que en el procedimiento de extracción no se utilizó isopropanol. Posteriormente se debe remover todo el volumen de etanol para finalmente eluir en agua estéril el DNA.

La ventaja de este método es que se puede utilizar para distintas muestras como tejido con una alta cantidad de lípidos como la piel, muestras óseas recientes o antiguas, y generalmente muestras con una cantidad grande de DNA. La desventaja de este método es que el procedimiento se puede prolongar por mucho tiempo, se copurifican muchos contaminantes como sales y fenoles, la toxicidad del fenol al ser una sustancia corrosiva y que puede afectar el tracto gastrointestinal, piel y mucosas; además es posible perder material genético por el número de pasos del procedimiento y es necesaria una cantidad grande de muestra por lo que no es recomendado utilizarse en muestras con un alto grado de degradación. (Goodwin, W. *et. al.*, 2007; Cattaneo, C. *et. al.* 2006)

Extracción con sílica.

Este método de extracción se ha popularizado en el ámbito forense debido a la simplicidad y especificidad de la técnica. El fundamento de la extracción con sílica se basa en la unión a partículas de dióxido de silicio (SiO_2) a DNA a través de moléculas intermediarias denominadas sales caotrópicas.

Después de la lisis celular se adiciona la sílica y la sal caotrópica en una alta concentración. El objetivo de la sal caotrópica es desorganizar los puentes de hidrógeno haciendo que se desnaturalicen las proteínas mientras que los ácidos nucleicos mantienen estabilidad en su grupo fosfato en comparación de otros componentes celulares, además de que algunas proteínas son desnaturalizadas fácilmente. La sal caotrópica forma un puente salino entre la sílica y el material genético permitiendo aislar de manera selectiva el DNA (Butler, J. 2009; Goodwin, W. *et. al.*, 2007). El tiocianato de guanidina se une directamente a los fosfatos con

carga negativa del esqueleto del DNA y por el otro lado se une a la sílica de la misma manera. La elección del uso del tiocianato de guanidina (GuSCN) como sal caotrópica se tomó con base en el estudio realizado por Rohland, 2007, en el cual pone a prueba distintas sales encontrando que hay una mayor recuperación de DNA con tiocianato de guanidina en una concentración 5M.

Una vez que se genera la unión entre la sílica y la sal caotrópica, la retención del DNA es tal que se puede realizar lavados con etanol diluido generalmente al 70 % para remover contaminantes o posibles inhibidores y el material genético seguirá unido a la matriz de sílica. El rompimiento de la unión entre el tiocianato con el DNA se logra al adicionar agua, provocando que se desestabilice el puente salino y debido a que el DNA es polar siempre tendrá afinidad por ésta. De manera sencilla, la sílica se remueve por centrifugación al estar compuesto de partículas densas que precipitan durante la extracción permitiendo remover el agua junto con el material genético (Tan, S.et.al. 2009)

Las ventajas de este método son que selectivamente se purifica el DNA de otros componentes celulares que pueden llegar a inhibir la PCR (en comparación con la extracción fenólica), es posible llevar a cabo lavados con etanol sin afectar la unión con la sal caotrópica, además no se utiliza ningún compuesto tóxico durante la extracción y se pueden utilizar distintas sales con diferentes afinidades para obtener una mayor concentración de DNA; la técnica no involucra muchos pasos evitando una posible contaminación y es posible utilizarse para muestras críticas aislando directamente la poca cantidad de DNA. Se puede utilizar para distintas muestras como saliva, cabello, huesos, tejido blando (músculo, hígado, etc) y por supuesto cartílago. Las desventaja de este método recae en que si existe una cantidad alta de contaminantes en la muestra pueden impedir estéricamente la unión del DNA a la matriz de sílica afectando la recuperación del DNA (Cattaneo, C.et.al. 2006)

Cuantificación de DNA

Después de la extracción es necesario conocer la cantidad de DNA en cada muestra que se analiza. Adicionar la cantidad correcta de DNA en PCR generará mejores resultados y la obtención de un perfil genético para su identificación. En el área forense la cuantificación es importante para determinar la concentración de DNA de muestras, conocer el grado de degradación que presentan, estandarizar o validar algún procedimiento de extracción y determinar la presencia de inhibidores. La cantidad de DNA para muestras de referencia se mantiene constante, por lo que es menos importante obtener los valores de cuantificación, en cambio, para muestras críticas siempre se debe conocer la cantidad de DNA (Goodwin, W. et. al., 2007).

Actualmente la técnica más utilizada en laboratorios de genética forense es la cuantificación por PCR en tiempo real, la cual ha revolucionado el campo del diagnóstico molecular gracias a su gran especificidad y sensibilidad. El principio se basa en la detección de productos amplificables por medio de la medición de los cambios de fluorescencia durante la amplificación. La fluorescencia es emitida gracias a que las sondas utilizadas vienen acopladas con una molécula fluorescente en el extremo 5' y una molécula denominada como *quencher* en el extremo 3'. Cuando ambos se encuentran juntos, el *quencher* se encarga de disminuir la fluorescencia emitida por la molécula previniendo que se active. La señal de fluorescencia solo se emite cuando la sonda se rompe liberando la molécula fluorescente. Los primers se alinean a la secuencia de interés y junto a éstos la sonda fluorescente también, durante la fase de extensión la actividad de exonucleasa de la Taq polimerasa, al pasar por la sonda, produce una ruptura liberando ambas moléculas; por lo que la fluorescencia aumentará cada ciclo de extensión conforme se sintetizan nuevas hebras de DNA (Figura 7) (Arya, M. et.al. 2005; Timken, M. et.al 2005)

Finalmente la fluorescencia emitida es detectada por un termociclador específico para PCR en tiempo real y mediante un software se producirán gráficas con los datos de emisión de fluorescencia.

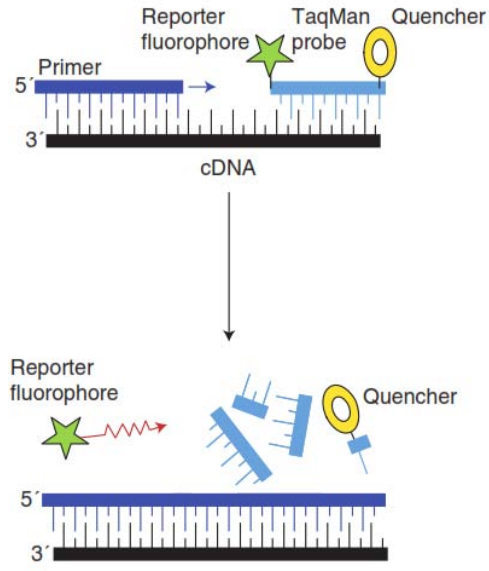


Figura 7. Fundamento de la cuantificación por PCR en tiempo real. Los primers utilizados en la reacción de PCR contienen una sonda TaqMan que contiene una molécula fluorescente y un *quencher* el cual evita que se libere la fluorescencia. Posteriormente cuando se amplifica la DNA polimerasa rompe la sonda y libera ambas promoviendo que se libere la fluorescencia en cada ciclo de extensión. Tomado de Arya, M. et.al. 2005

Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) o reacción en cadena de polimerasa es una técnica enzimática empleada para amplificar un segmento específico de DNA con el objetivo de generar miles de millones de copias a partir de una sola molécula de material genético. Desarrollado por Kary Mullis en 1984 la técnica de PCR revolucionó la manera en que se podía analizar

el DNA *in vitro*, siendo ahora una técnica indispensable en laboratorios de biología molecular. Dentro del área forense la técnica se utiliza para generar muchas copias de DNA a partir de la mínima cantidad de material genético encontrada en muestras forenses, por lo que se puede obtener suficiente DNA a partir de manchas o gotas de sangre y hasta de un solo cabello (Ishmael, F. et.al. 2008).

La enzima encargada de la PCR es la DNA polimerasa, la cual fue aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, ya que sostiene la actividad enzimática a altas temperaturas y puede resistir a ciclos de disminución y aumento de temperatura necesarios en la reacción de PCR (Singh, J. et.al. 2014; Ishmael, F. et.al. 2008)

Una reacción de PCR requiere de cinco componentes: la DNA polimerasa termoestable, nucleótidos trifosfatos o dNTP's, la muestra de DNA a amplificar o templado, oligonucleótidos o también denominados primers y un buffer donde se mantiene químicamente la reacción. Los primers son regiones cortas de nucleótidos (aproximadamente 20 pares de bases) sintetizados *in vitro*, los cuales son complementarios a la región de interés alineándose con ésta al principio y al final de la secuencia para que la DNA polimerasa comience la síntesis de la nueva hebra de DNA. Los nucleótidos trifosfato dNTP's son las bases con los cuales la DNA polimerasa sintetiza la nueva hebra de DNA colocando uno a uno durante la reacción. El buffer en la reacción debe contener MgCl₂ el cual funciona como un cofactor para la DNA polimerasa haciendo que aumente su especificidad (Singh, J. et.al. 2014).

La reacción se realiza a través de una serie de ciclos de 3 pasos consecutivos a diferentes temperaturas. Estos ciclos de temperaturas son realizados por medio de un termociclador que permite controlar los rangos de temperatura durante la reacción. Los tres pasos involucrados son desnaturalización, alineamiento o hibridación y finalmente extensión. En el primer paso el DNA se desnaturaliza a altas temperatura (95-97⁰C) separando los puentes de hidrógeno que unen a las bases nitrogenadas. En la hibridación se disminuye la temperatura (60-65⁰C) permitiendo que los primers se puedan alinear con la secuencia o secuencias de de interés y finalmente durante la extensión la polimerasa sintetiza las nuevas hebras de DNA adicionando los dNTP's a una temperatura de 72⁰C, en la cual la enzima tiene efecto. El número de productos generados durante todo el proceso de PCR es exponencial y se puede generar hasta 2³⁶ copias .El número de ciclos en los que ocurren estos 3 procesos es relativo y debe ajustarse de acuerdo a las muestras que se está trabajando, ya que en muestras forenses no es recomendable utilizar más de 34 ciclos en muestras degradadas por que puede dar pie a uniones inespecíficas de primers por la poca cantidad de DNA. Cada componente en la reacción se adiciona a una concentración determinada, por

ejemplo si se adiciona una mayor cantidad de ClMg_2 resulta en amplificación inespecífica al aumentar la capacidad de la polimerasa (Singh, J. et.al. 2014).

La ventaja de utilizar PCR radica en que es una técnica simple, altamente sensible y rápida para producir copias para su análisis. Las desventajas son que al ser sensible cualquier forma de contaminación puede alterar los resultados, así como también algunos componentes de muestras biológicas pueden inhibir PCR.

Los inhibidores de PCR son compuestos químicos heterogéneos que durante la extracción de DNA pueden ser purificados y afectan directamente en la amplificación de los microsatélites. Los mecanismos de inhibición pueden afectar la PCR mediante la interacción de inhibidores con el DNA, unión de inhibidores a la polimerasa e interacción con polimerasa durante la extensión. Compuestos inorgánicos como iones calcio evitan la unión del Mg^{2+} afectando la actividad enzimática de la Taq polimerasa, así como también el colágeno, hematina y ácidos tánicos. La melanina forma un complejo reversible con la DNA polimerasa y algunos polisacáridos pueden modificar el proceso enzimático, mimetizando la estructura de los ácidos nucleicos. Los ácidos húmicos interactúan con el DNA y evita que la polimerasa se pegue aún a bajas concentraciones. El grupo hemo de la sangre bloquea el sitio activo de la polimerasa evitando su actividad (Alaeddini, R. 2012; Buttler, J. 2012). Componentes utilizados en la extracción que también pueden inhibir la PCR son el etanol, isopropanol, y detergentes como el SDS, trizol, entre otros. El fenol también es un inhibidor de la PCR ya que puede degradar polimerasas e inactivarlas completamente, además de unirse al DNA promoviendo el rompimiento de puentes de hidrógeno, disminuyendo la temperatura de desnaturalización (McCord, B. et.al. 2015.; Alaeddini, R. 2012). Existen diferentes maneras para evitar que la PCR se inhiba, se puedan producir perfiles completos y con una mejor calidad: las diluciones permiten reducir la concentración de inhibidores en una muestra, sin embargo también disminuyen la concentración de DNA; el uso de polimerasas de mayor especificidad y la BSA (albúmina de suero bovino) que es una proteína que se une directamente a inhibidores permitiendo que la reacción ocurra en presencia de éstos. El sistema de Promega PowerPlex®System trabajan bajo inhibidores ya que incluye BSA (Bessetti, J. 2007; Goodwin, W. et. al., 2007).

Los sistemas de amplificación utilizados en genética forense permiten el análisis simultáneo de cierto número de marcadores en la misma reacción. Este tipo de PCR se denomina multiplex y anteriormente fue utilizada para detectar la presencia de los 13 loci de CODIS y hoy se puede genotipificar hasta 27 marcadores. Para detectar los productos de PCR, se analizaban en electroforesis con geles de poliacrilamida y tinción de plata. Actualmente, los productos de PCR son marcados con fluorescencia durante la amplificación, ya que se utilizan

sondas fluorescentes unidas al extremo 5' de los primers, para que sean analizadas posteriormente por electroforesis capilar. Se pueden utilizar hasta 5 sondas fluorescentes distintas en una reacción de PCR dependiendo del kit de STR que se utilice y cada sonda fluorescente se alinea con distintos marcadores para su análisis (Goodwin, W. *et. al.*, 2007)

PowerPlex® Fusion System

Este sistema de amplificación permite la detección simultánea de 24 marcadores en una misma reacción de PCR (Figura 8). Un número alto de marcadores permite que haya una alta discriminación para estudios de relación de parentesco y que se pueda compartir información con otros laboratorios forenses en todo el mundo homogeneizando la cantidad y tipo de marcadores. De acuerdo a los estudios de validación del kit es posible la detección de todos los alelos en una concentración de 0.1 ng (100 pg) y más del 90% de los alelos en una concentración de 0.05ng permitiendo una alta sensibilidad en el análisis de microsatélites. La probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar tengan un genotipo idéntico en un locus en específico calculado para el kit es de 6.58×10^{-29} , lo que se traduce en una probabilidad de 1 en más de un cuatrillón, superando la población mundial (Oostdik, D. *et.al.* 2014; Buttler, J. 2012).

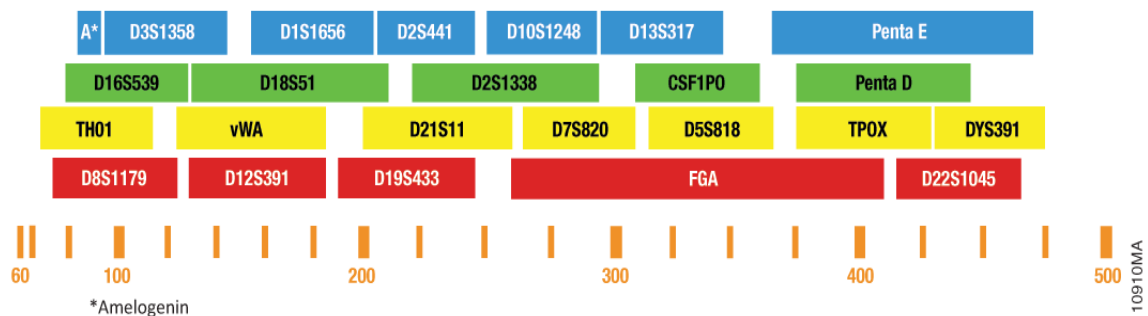


Figura 8. 24 marcadores amplificados en el Power Plex Fusion System. Cada color indica la sonda fluorescente con la que está marcada. El color naranja representa el size estándar y nos refleja el tamaño de los marcadores que se utilizaron en el estudio.

Análisis de fragmentos de DNA

Electroforesis capilar

El análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR se realiza por electroforesis. La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas como DNA, RNA y proteínas a través de una matriz por medio de su tamaño, densidad y su carga. La separación se lleva a cabo aplicando un campo eléctrico que permite que las

cargas positivas se dirijan hacia el cátodo (electrodo cargado negativamente) y las moléculas con carga negativa hacia el ánodo (electrodo cargado positivamente) como ocurre con el DNA (Buttler, J. 2012).

Para la genotipificación actual de muestras forenses se utiliza una técnica diferente denominada electroforesis capilar. Este tipo de electroforesis introducido a mediados de los años 90's se basa en el mismo principio que electroforesis en gel. La separación de los fragmentos de la PCR se realiza en capilares, los cuales son tubos de vidrio que pueden llegar a medir hasta 50 cm de largo y 50 μm de diámetro, los cuales son llenados con un polímero viscoso que actúa como un gel separando las moléculas de DNA por tamaño. El campo eléctrico es de 10 a 100 veces mayor en el capilar que en gel obteniéndose resultados en un tiempo menor. La detección de la muestra se lleva a cabo a través de la medición de la fluorescencia emitida por los productos de PCR por medio de un láser de argón que incide directamente en la muestra, provocando que las moléculas fluorescentes se exciten generando una emisión de luz de una longitud de onda diferente que es detectada por un dispositivo fotosensible (Figura 9) (Buttler, J. 2012).

El analizador genético utilizado en el estudio contiene un dispositivo fotosensible para detección de 5 sondas fluorescentes de aproximadamente 520 nm hasta 620 nm. Las sondas fluorescentes permiten analizar diferentes loci de microsatélites, cada una con un color distinto. La fluorescencia detectada determinará la altura de los picos de cada alelo en unidades de fluorescencia relativa (RFU's).

Antes de realizar este análisis, a cada una de las muestras se debe adicionar un set de fragmentos de DNA conocidos denominados como "size standard" que permiten correlacionar los resultados del tamaño de los productos de PCR (similar al marcador de peso molecular). Se debe agregar formamida para desnaturalizar la cadena de DNA asegurando que los productos de la PCR se mantengan de una sola cadena. Se adiciona también una escalera alélica, la cual es una mezcla artificial de los alelos más comunes presentes en la población para un marcador STR en particular y como se mencionó previamente, cada alelo se caracteriza en términos del número de repetidos de la secuencia del microsatélite. El polímero utilizado permite mantener constante la corriente eléctrica a lo largo del capilar y evita que se forme cualquier estructura secundaria entre los fragmentos analizados por la presencia de urea (Goodwin. W. *et. al.*, 2007; Buttler, J. 2012)

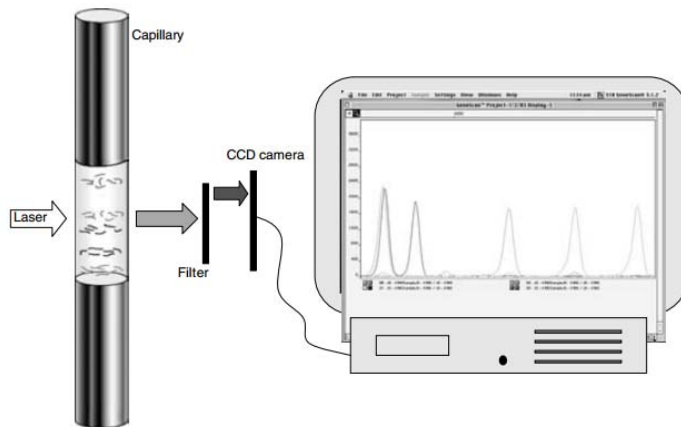


Figura 9. Detección de productos amplificados por electroforesis capilar. Los fragmentos de DNA migran a través de un capilar hasta que son interceptados por un láser el cual incide sobre las moléculas fluorescentes. La fluorescencia resultante es captada por una cámara especial y mandada al software para su análisis. Tomado de Goodwin. W. *et. al.*, 2007

El resultado final de la genotipificación es la generación de un electroferograma o perfil genético que muestra todos los alelos presentes para cada marcador STR en un individuo. El perfil genético de una muestra biológica será siempre el mismo para cada marcador STR, independientemente de los diferentes métodos utilizados para extracción, cuantificación y amplificación.

El fenómeno de *drop out* se genera cuando un alelo es preferencialmente amplificado dando la impresión de que un locus en particular puede ser homocigoto. Esto a su vez genera un desbalance en el tamaño de los picos en caso de heterocigotos. En un perfil de buena calidad ambos picos presentan la misma altura, sin embargo, debido a la amplificación preferencial de un alelo la altura se modifica. Para poder reconocer que un locus en particular es heterocigoto, el pico que es ligeramente más pequeño y debe tener en promedio un 90% de la altura del pico más alto (Goodwin, M. *et. al.*, 2007).

El fenómeno de *drop in* se refiere a la adición de 1 o 2 alelos en un perfil por contaminación, dificultando la interpretación de los electroferogramas. Para discriminar este fenómeno es necesario procesar nuevamente las muestras desde la extracción utilizando los respectivos controles positivos y negativos de reactivos, con el objetivo de identificar la fuente de contaminación (Kayser, M. *et. al* 2011).

Justificación

La identificación humana es importante en muchas investigaciones criminales, aportando elementos que permiten establecer probables teorías del caso acerca de un hecho delictivo. Otro aspecto fundamental de la identificación humana a través del DNA es que permite devolver el cadáver a los familiares, en casos donde las alternativas de identificación han sido superadas no pudiendo generar información suficiente para probar la relación de parentesco que se presume.

En México el incremento de fosas clandestinas o “narcofosas” así como víctimas de secuestro y otras actividades producto de la delincuencia organizada dan como resultado una gran cantidad de cadáveres sin identificar. Las estadísticas del Instituto de Ciencias Forenses de la Ciudad de México señalan que ingresan alrededor de 5,000 cadáveres al año, de éstos aproximadamente un 10% corresponden a individuos desconocidos. Los registros del año 2010 a Enero del 2015, revelaron que aproximadamente dos mil ciento cinco personas aún no han sido identificadas.

En estos casos la recuperación tardía de cuerpos y su avanzado estado de putrefacción obligan el empleo de huesos como único recuso en los estudio de DNA. Sin embargo, se ha demostrado que el cartílago es viable aún en estados de putrefacción avanzada, lo que representa una fuente rica de DNA que puede analizarse y procesarse de una manera más sencilla que los restos óseos. Ante ésta situación es necesario estandarizar métodos de extracción que agilicen el análisis de este tipo de muestras, garantizando perfiles genéticos fiables para la identificación.

La importancia de la estandarización radica en la exigencia de calidad para técnicas y ensayos utilizados por laboratorios forenses, demostrando que dichos procedimientos cuentan con fundamento científico, cubriendo los requisitos mínimos necesarios para la generación de resultados con respaldo sólido y contundente, así como datos confiables que pueden ser reproducidos en cualquier laboratorio. Los métodos a estandarizar para estas muestras son de bajo costo, sin pasos excesivos que permitan pérdida de material genético y adaptables a diversas muestras empleadas en laboratorios forenses. Por las consideraciones anteriores es necesario implementar en el laboratorio de genética del Instituto de Ciencias Forense del Tribunal Superior de Justicia de la Ciudad de México, técnicas de extracción para muestras de cartílago provenientes de cadáveres y restos altamente degradados con el fin de generar perfiles genéticos para su futura identificación.

Hipótesis

A pesar que la extracción orgánica es efectiva según demuestra su uso en una amplia variedad de tipo de muestras, en ocasiones la oportunidad de generar un perfil suele ser más baja debido a la presencia de inhibidores, sin embargo, la especificidad que el método de extracción de sílica tiene respecto al DNA impide la copurificación de inhibidores, esto hace suponer que será mayor la concentración y calidad de DNA recuperado permitiendo generar un mayor número de perfiles genéticos.

Objetivo

El objetivo general del presente trabajo es estandarizar y evaluar dos técnicas de extracción de DNA a partir de muestras de cartílago de arcos costales y extremos articulares de huesos largos recabados de cadáveres y restos altamente degradados, con la finalidad de implementar la técnica que proporcione mejores resultados para la generación de perfiles genéticos con microsatélites STR's, para una futura identificación.

Objetivos particulares

a) Estandarizar las técnicas de extracción de DNA fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y sílica que permitan un rápido y correcto procesamiento de muestras de cartílago.

b) Cuantificar por medio de PCR en tiempo real la cantidad de DNA humano extraído y purificado de cada muestra.

c) Amplificar el DNA por medio de la técnica de PCR, empleando el kit PowerPlex® Fusion System de la marca Promega, integrado por 24 microsatélites STR's.

d) Analizar los fragmentos obtenidos por la técnica de PCR, mediante electroforesis capilar para la generación de perfiles genéticos.

e) Comparar las técnicas de extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y sílica, evaluando la cantidad del DNA recuperado de 30 casos mediante análisis estadístico.

f) Implementar en el laboratorio de genética del INCIFO una técnica de extracción de DNA a partir de cartílago proveniente de muestras altamente degradadas, con el fin de generar una base de datos para futuros procesos de identificación.

Método

Toma de muestra.

Se incluyeron en el estudio 30 muestras de cartílago pertenecientes a individuos no identificados ingresados al INCIFO que presentaban fenómenos cadavéricos tardíos, de éstas, 29 se tomaron de cadáveres y una de un resto humano (pie izquierdo). En la tabla 2 se describen las muestras recabadas señalando su respectivo fenómeno cadavérico (en 5 cadáveres fue posible la toma de muestra de cartílago distal y costal).

Cartílagos costales

Se aprovechó la incisión realizada durante la necropsia para acceder a este tipo de muestra, abriendo a la altura del pecho, fracturando el arco costal, removiendo manualmente un fragmento con un tamaño aproximado de 4 cm de costilla y 3 cm de cartílago. La muestra entonces fue colocada en un tubo nuevo y estéril de 50 mL.

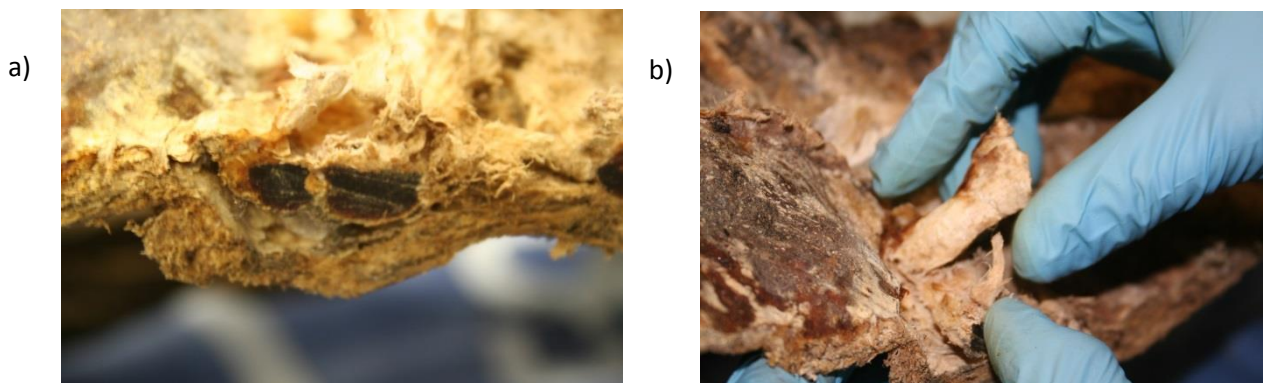


Imagen 9. Cartílago costal del individuo momificado.

a) Identificación del cartílago costal que será removido.

b) Remoción del cartílago para su traslado en un tubo estéril de 50 mL.



Imagen 10. Visualización de astrágalo con presencia de cartílago de pie izquierdo. Única muestra de restos humanos.

Cartílagos distales

Se tomaron lascas de cartílago de aproximadamente 0.5 cm de diámetro con hojas de bisturí nuevas y estériles de las regiones distales de huesos de cúbito y fémur. Las muestras entonces fueron colocadas en un tubo nuevo y estéril de 15 mL. La toma se favoreció, debido a la exposición de la muestra (Imágenes 9 y 10).

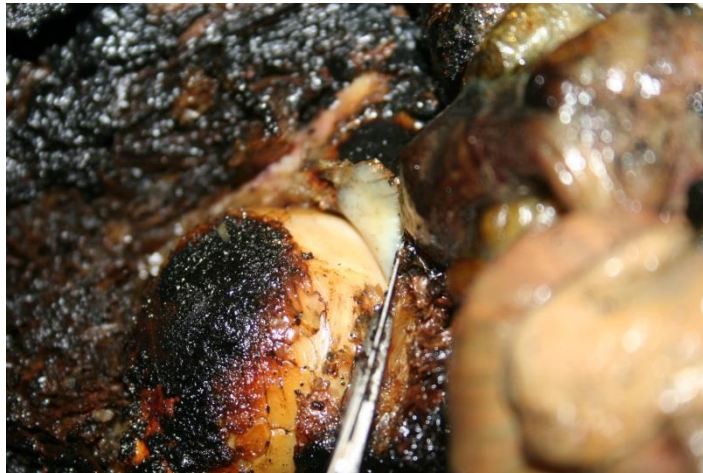


Imagen 11. Corte de lascas de cartílago de cabeza de fémur del cadáver número 21, en el cual se muestra carbonización de la periferia.



Imagen 12. Resguardo para el transporte de las lascas de cartílago en un tubo estéril de 15 mL.

Tabla 2. Muestras obtenidas de cartílago costal y/o distal de 30 individuos no identificados con respectivo fenómeno cadavérico.

Muestra	Fenómeno cadavérico	Cartílago costal	Cartílago Distal
1	Fase enfisematosa	X	
2	Fase de licuefacción	X	
3	Saponificado	X	
4	Fase enfisematosa	X	
5	Fase enfisematosa	X	
6	Saponificado	X	
7	Fase enfisematosa	X	
8	Fase enfisematosa	X	
9	Fase enfisematosa	X	
10	Fase de licuefacción	X	
11	Fase de licuefacción	X	
12	Fase enfisematosa	X	
13	Fase enfisematosa	X	
14	Fase de licuefacción	X	
15	Fase de licuefacción	X	
16	Saponificado	X	
17	Corificado	X	
18	Momificado	X	
19	Calcinado	X	X
20	Calcinado	X	X
21	Calcinado	X	X
22	Calcinado	X	X
23	Saponificado	X	X
24	Fase de licuefacción	X	
25	Fase enfisematosa	X	
26	Fase de licuefacción	X	
27	Saponificado	X	
28	Fase de licuefacción	X	
29	Saponificado	X	
30	Restos humanos (pie izquierdo)	X	

Procesamiento de las muestras.

A cada muestra se le removió todo el tejido blando adherido utilizando un bisturí. Con ello se eliminó tejido putrefacto y sedimentos reduciendo la presencia de agentes contaminantes (Imagen 13)



Imagen 13. Remoción de tejido blando adherido al cartílago con un bisturí. Muestra de cadáver carbonizado

Posteriormente cada muestra se lavó en un vaso de precipitado con una mezcla de agua y detergente comercial (500 mL de agua por 1 gramo de detergente), cubriendo en su totalidad la muestra. La solución fue puesta en un agitador magnético toda la noche con el fin de eliminar tejido blando no removido con el bisturí así como sangre putrefacta (imagen 14). Al finalizar, se realizó un lavado con abundante agua para remover los residuos de detergente y materia orgánica desprendida. El exceso de agua fue eliminado con papel absorbente, entonces la muestra es puesta a secar a temperatura ambiente por al menos 24 horas y guardada en un sobre para su uso posterior.



Imagen 14. Lavado de muestras en en mezcla de detergente con agitación magnética por una noche.

Con respecto a la limpieza de las 5 muestras de cartílago distal (lajas), a éstas se les agregó 10 mL de la mezcla de agua y detergente. Se sometieron a agitación para remoción de tejido blando. El exceso de agua se eliminó con papel absorbente, la muestra fue puesta a secar a temperatura ambiente por al menos 24 horas y guardada en un sobre para su uso posterior.

Las 30 muestras de cartílago fueron llevadas a punto de polvo utilizando una lima plana bastarda del número 6 (Truper®). El polvo es recuperado en un vidrio de reloj.

Para estandarizar la cantidad necesaria de cartílago en polvo y poder generar un perfil completo se procesaron 3 muestras con 50 mg (tabla. 3).

Tabla 3. Cuantificación de DNA obtenido con ambos métodos de extracción. Estandarización con 50 mg de polvo de cartílago y una elución final de 35 μ L de agua

Muestra	Fenol ng/ μ L	Sílica ng/ μ L
4	11.12	11.15
8	15.61	16.52
20	17.2	16.53

Derivado del resultado de la cuantificación con 50 mg de cartílago, se decidió disminuir la cantidad a 25 mg con intención de obtener DNA en un rango de 0.5 a 10 ng/ μ L en un volumen final de 35 μ L.

La cantidad de muestras de cartílago distal tomada no fue suficiente para llegar a 25 mg de polvo, por lo tanto, las 5 muestras se trabajaron con 12.5 mg.

Cada muestra se pesó por duplicado, una muestra para la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y otra muestra para la extracción con sílica.

Extracción de DNA

Lisis celular

a) A cada muestra se le adicionó 250 μ L de Buffer de lisis (tris HCL 10 mM, EDTA 0.1M y SDS 2%) y 10 μ L de Proteinasa K (10mg/mL), se incubó a 65 °C durante 25 minutos en agitación constante a 1100 rpm en el termoshaker.

b) Se adicionó 2.5 μ L de DTT (DL-Dithiothreitol) y se vuelve a incubar según el inciso a) por 20 minutos. Finalizando el tiempo se aumentó la temperatura a 70°C

por 15 minutos. Esto se realizó para todas las muestras, independientemente del método de purificación.

Purificación de DNA.

Método fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (extracción orgánica)

a) El lisado de cada muestra se centrifugó a 15,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 1.7 mL con el fin de remover el cartílago que no fue lisado.

b) Se adicionó al sobrenadante un parte igual de fenol:cloroformo:alcohol Isoamílico (Amresco®, Biochemicals and Life Science). La mezcla se agitó con Vortex (Labnet International, Inc) por 1 minuto con velocidad máxima para emulsionar la mezcla.

c) La mezcla emulsionada se centrifugó por 15 minutos a 15,000 rpm a temperatura ambiente permitiendo que se separen en una fase orgánica y otra acuosa. La manipulación de los tubos debe ser con cuidado para evitar algún movimiento brusco que pueda mezclar nuevamente las fases.

d) La fracción superior correspondiente a la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 1.7 mL. Es importante no tocar la fracción intermedia ni la fracción inferior con el objetivo de no dejar pasar fenoles y trazas de proteína.

e) A la fracción recuperada se le adicionaron 3 partes de etanol absoluto y se mezcló por inversión o agitación en vortex durante un minuto para homogeneizar la mezcla de etanol con la fracción acuosa. Posteriormente se centrifuga a 15,000 rpm por 35 minutos a 0°C.

g) Se eliminó el sobrenadante lentamente evitando tocar las paredes y fondo del tubo y se dejó secar el tubo para eliminar los restos de etanol en el termoblock por 10 minutos a 65°C.

h) Finalmente se adicionó al tubo 35 µL de agua estéril libre de nucleasas para diluir el DNA. La muestra se almacena entonces a 4°C.

Método de sílica

a) El lisado de cada muestra se centrifugó a 15,000 rpm y el sobrenadante se colocó en otro tubo estéril nuevo de 1.7 mL con el fin de remover el cartílago que no fue lisado.

b) Al lisado se le adicionó 3 partes de tiocianato de guanidina 5.0 M, pH 4-5.

c) Se adicionó a la mezcla 15 µL de sílica en gel y se mezcló en vórtex por 1 minuto hasta homogeneizar todos los componentes.

- d) La muestra entonces se centrifugó a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 1 minuto, y se eliminó el sobrenadante evitando tocar o remover el botón de sílica.
- e) Se adicionó al botón 400 μL de etanol al 70%, se agita en vortex por 1 minuto hasta disolver el botón.
- f) Se repite el paso del inciso d), y el botón se colocó en termoblock por 10 minutos a 65°C hasta sequedad.
- g) Al botón se le adicionó 35 μL de agua estéril libre de nucleasas y se agitó en vortex hasta disolver el botón.
- h) Finalmente la muestra se centrifugó a 15,000 rpm a temperatura ambiente por 1 minuto para formar de nuevo un botón de sílica, se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA transfiriendo a un tubo nuevo y estéril de 1.7 mL. La muestra se almacenó a 4°C .

PCR tiempo real (cuantificación).

La cuantificación del DNA humano recuperado de las diferentes muestras se realizó con el kit Quantifiler® Duo DNA Quantification, de la compañía Applied Biosystems.

Para cada reacción se emplearon las siguientes cantidades:

Tabla 4. Cantidades en μL de reactivos del kit Power Plex Fusion® para una reacción de PCR con un volumen final de 25 μL

Reactivo	Cantidad (μL)
Quantifiler® Duo Primer Mix	10.5
Quantifiler® Duo PCR Reaction Mix	12.5
Producto de PCR	2
Total	25

Para realizar la cuantificación de DNA es necesario tener una curva de estándares de DNA control seriales, por lo tanto se preparó un stock con 30 μL de Quantifiler® Duo DNA Dilution Buffer + 10 μL de Quantifiler® Duo DNA Standard, siendo éste el estándar 1, se homogeniza y se toman 10 μL para agregarlos al estándar 2, se homogeniza el estándar 2 y se toman 10 μL para agregarlos al estándar 3 y así sucesivamente hasta el estándar 8. Las concentraciones finales quedan de la siguiente manera:

Tabla 5. Curva de preparación de estándares de DNA control. Se realiza las diluciones correspondientes para ajustar la concentración de la curva.

Estándar	Concentración (ng/μL)	Preparación
1	50	30 μL de Dilution Buffer + 10 μL DNA control *
2	16.70	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 1
3	5.560	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 2
4	1.850	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 3
5	0.620	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 4
6	0.210	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 5
7	0.068	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 6
8	0.023	20 μL de Dilution Buffer + 10 μL estándar 7

* concentración del DNA control 200ng/μL)

Se incorporó un control negativo consistente en agua estéril utilizada en las extracciones.

En el software 7500 System SDS se colocaron las condiciones de uso de acuerdo al manual de usuario del equipo, así como también las muestras procesadas.

PCR punto final

Se realizó por medio de una PCR multiplex de punto final con el kit PowerPlex® Fusion System que contiene microsatélites STR siguiendo las especificaciones del proveedor. Las cantidades de reactivos se mencionan en la tabla 6.

Tabla 6. Reactivos y volumen en μL utilizados para una reacción de PCR, con un volumen final de 25 μL.

Reactivos	Volumen (μL)
Master Mix	5
Primers	5
Agua	Hasta un volumen final 25
DNA (0.25 – 0.5 ng)	
Total	25 de volumen final

Las condiciones de termociclador fueron las siguientes:

Tabla 7. Condiciones de termociclado para una reacción de PCR con el kit Power Plex Fusion® a 28 ciclos.

Temperatura	Tiempo
96 °C	1 min, luego:
94 °C	10 seg
59 °C	1 min
72 °C	30 seg, luego:
60 °C	20 min
4 °C	∞

} 28 ciclos

Como control positivo se utilizó el DNA estándar que contiene el kit de PowerPlex® Fusion System. Como control negativo se utilizó agua estéril con el que se realizaron las extracciones.

Electroforesis capilar y genotipificación,

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador 3130 (Applied Biosystem), utilizando los siguientes reactivos.

Tabla 8. Reactivos y cantidades (en µL) utilizados por muestra en un ensayo de electroforesis capilar.

Reactivo	Volumen (µL)
Formamida desionizada	12
Estándar CC5	0.5
Producto de PCR	0.6

Cada once muestras se colocó un 1 µL de ladder alelico de PowerPlex® Fusion, para genotipificar las muestras.

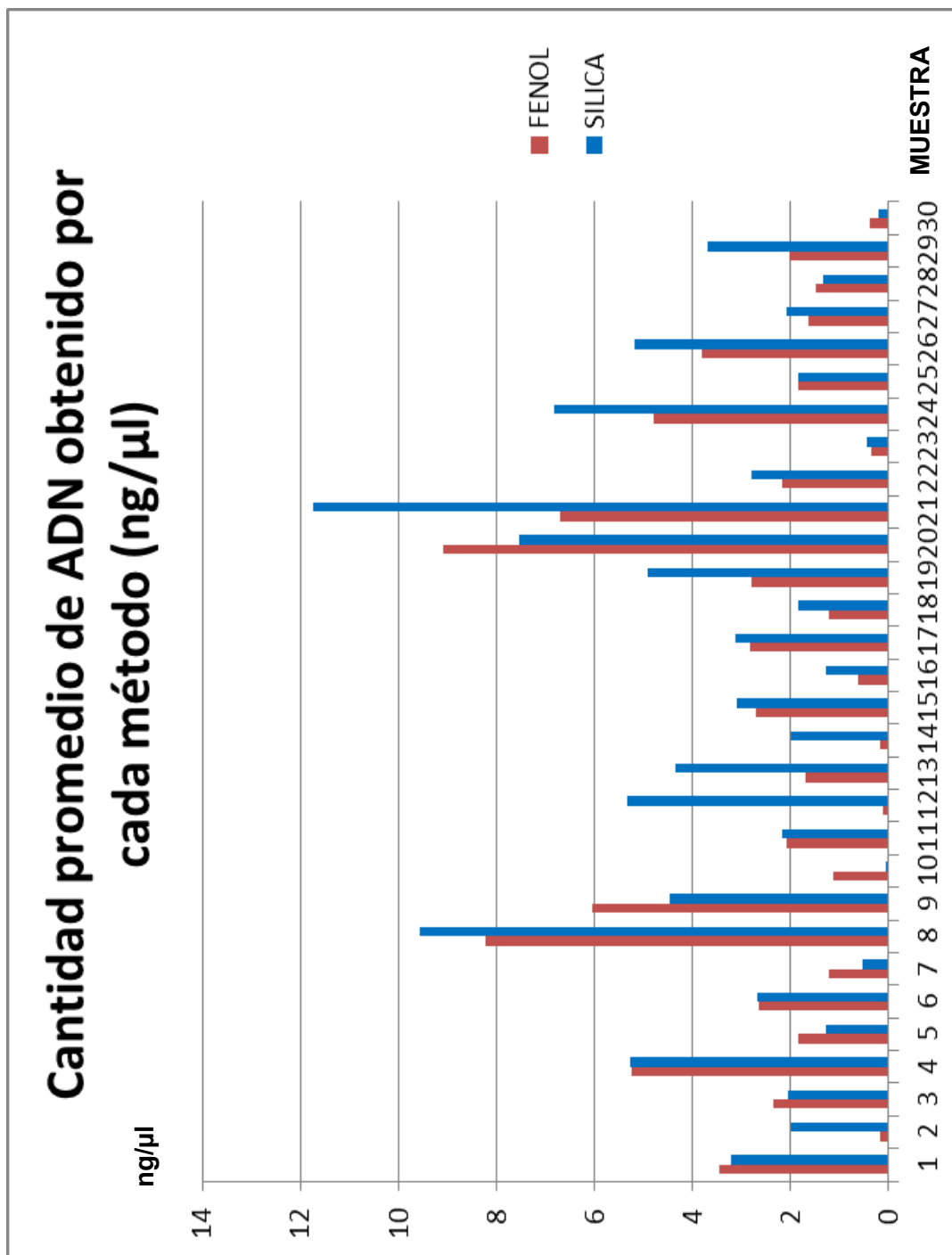
Las muestras fueron analizadas con el *software* GeneMapper ID-X, versión 1.0 (Applied Biosystems) para generar los perfiles genéticos.

Análisis de datos

Una vez obtenidos los resultados de las cuantificaciones con ambas técnicas de extracción se utilizó el programa Minitab® 17 para realizar las estadísticas. Se calculó el promedio de ambos métodos, así como también la comparación de los mismos con la prueba estadística *U de Mann-Whitney*. La calidad del DNA se analizó por medio de los perfiles genéticos

Resultados

Cuantificación



Gráfica 1. Cuantificaciones de cada muestra con ambos métodos. Estandarización con 25 mg de polvo de cartilago

Tabla 9. Cuantificaciones de cada muestra con ambos métodos.
Estandarización con 25 mg de polvo de cartílago

Muestra	FENOL ng/μL	SILICA ng/μL	Muestra	FENOL ng/μL	SILICA ng/μL
1	3.46	3.205	16	0.617	1.2795
2	0.16105	2.004	17	2.83	3.13
3	2.365	2.06	18	1.225	1.85
4	5.25	5.265	19	2.8	4.92
5	1.838	1.267	20	9.1	7.55
6	2.645	2.69	21	6.7	11.745
7	1.219	0.519	22	2.16	2.81
8	8.24	9.56	23	0.348	0.4405
9	6.05	4.47	24	4.8079	6.839
10	1.1165	0.0697	25	1.85	1.85
11	2.075	2.165	26	3.815	5.195
12	0.1105	5.32	27	1.625	2.095
13	1.6895	4.36	28	1.475	1.35
14	0.16965	1.985	29	2.025	3.69
15	2.71	3.11	30	0.389	0.2
			Promedio	2.695	3.433

Tabla 10. Cantidad de DNA obtenido en ng/μL. de las 5 muestras de cartílagos distales con 12.5 mg.

No. De muestra	Estado	Fenol ng/μL	Sílica ng/μL
19	Calcinado	6.75	7.69
20	Calcinado	7.85	13.32
21	Calcinado	3.35	5.87
22	Calcinado	4.4	5.37
23	Saponificado	.001	.002

Prueba estadística

De acuerdo a los valores obtenidos en la cuantificación de DNA se realizó la prueba estadística *U de Mann Whitney* para comparar si existen diferencias significativas entre los promedios obtenidos a partir de ambos métodos de extracción de DNA.

Tabla 11. Prueba estadística realizada para el estudio con un nivel de significancia de 0.05 y el calor P correspondiente.

Prueba Estadística	Nivel de significancia α	Valor P
U de Mann- Whitney	0.05	0.1958

Perfiles genéticos de cartílagos costales

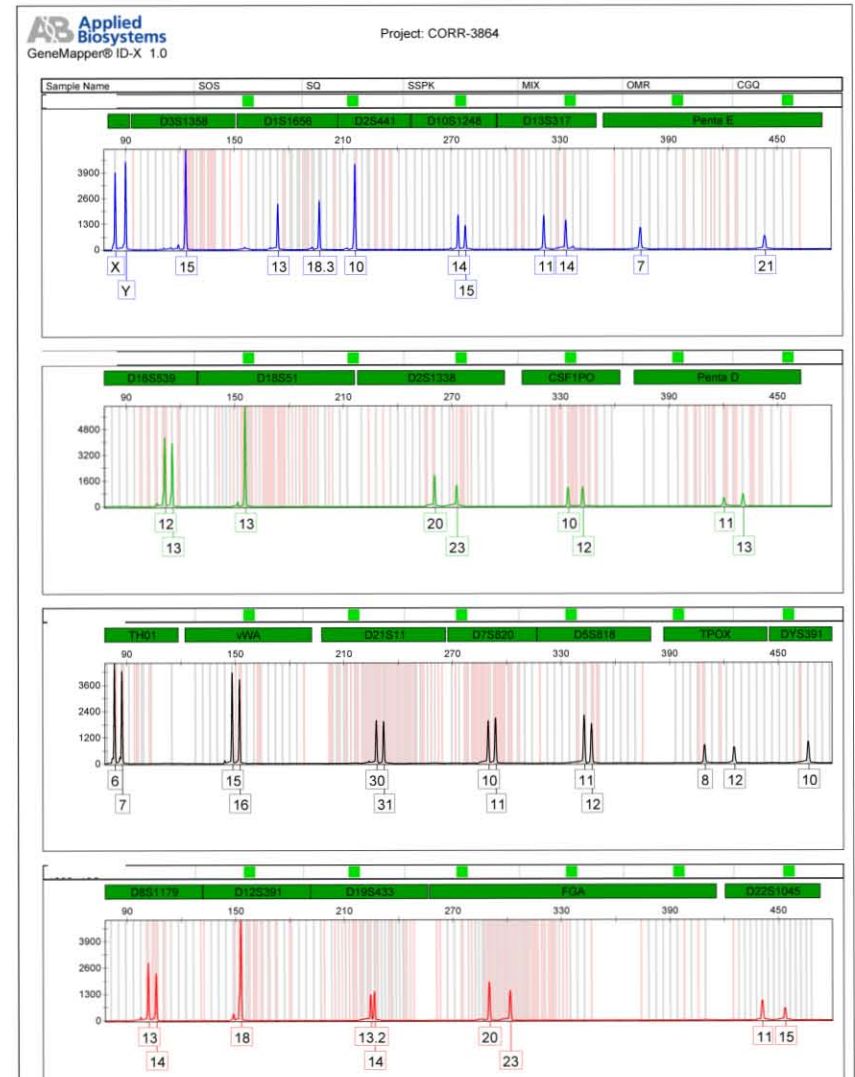
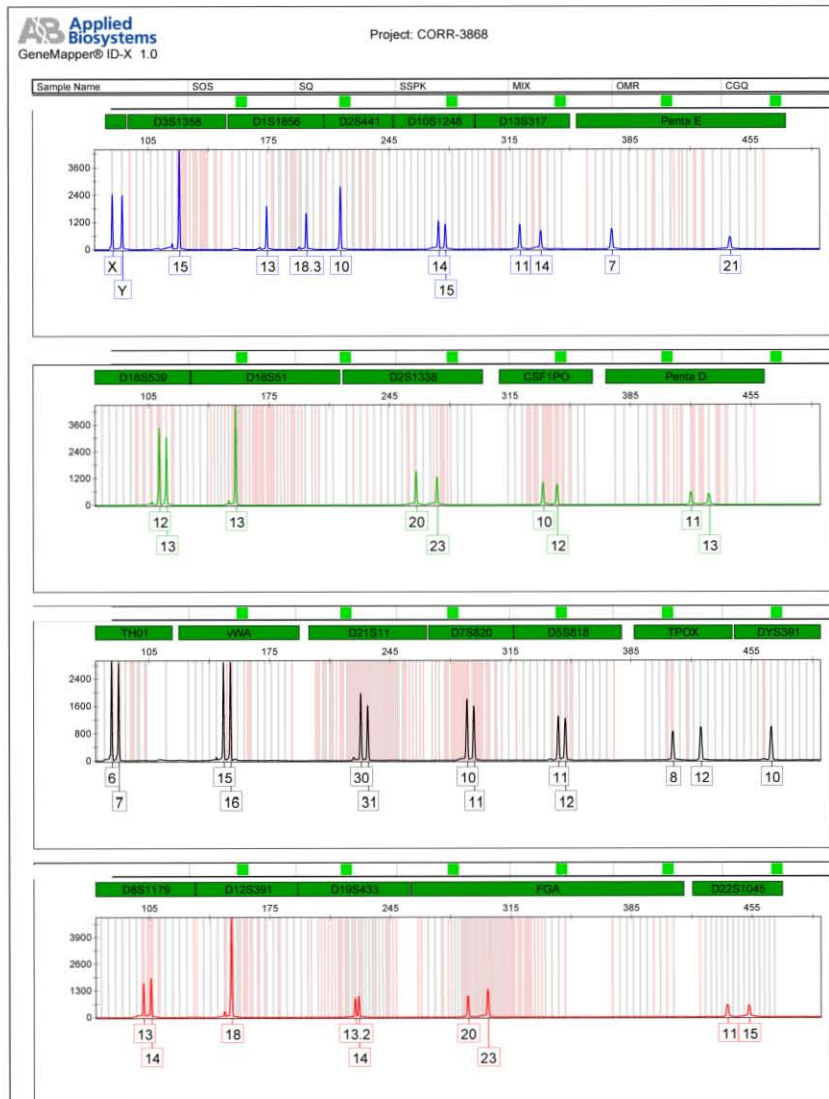


Figura 10. Perfiles genéticos de la muestra 25 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver en estado de putrefacción, específicamente en la fase enfisematosa. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.

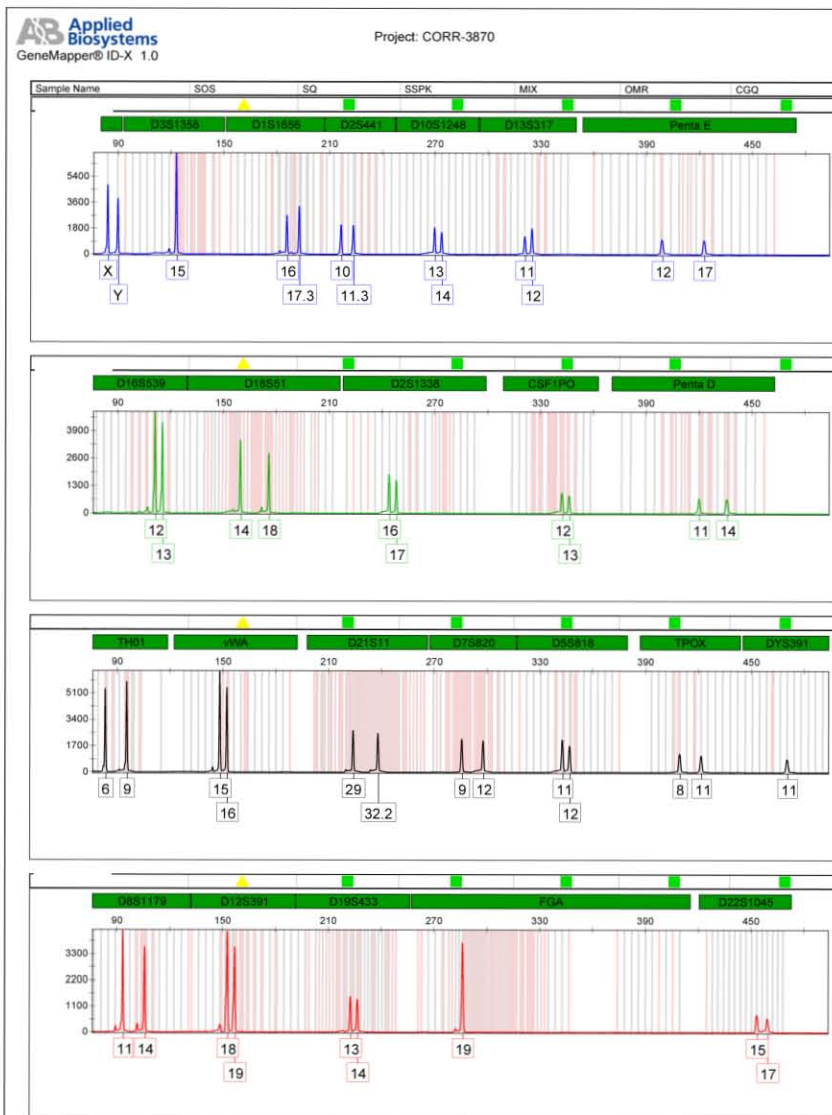
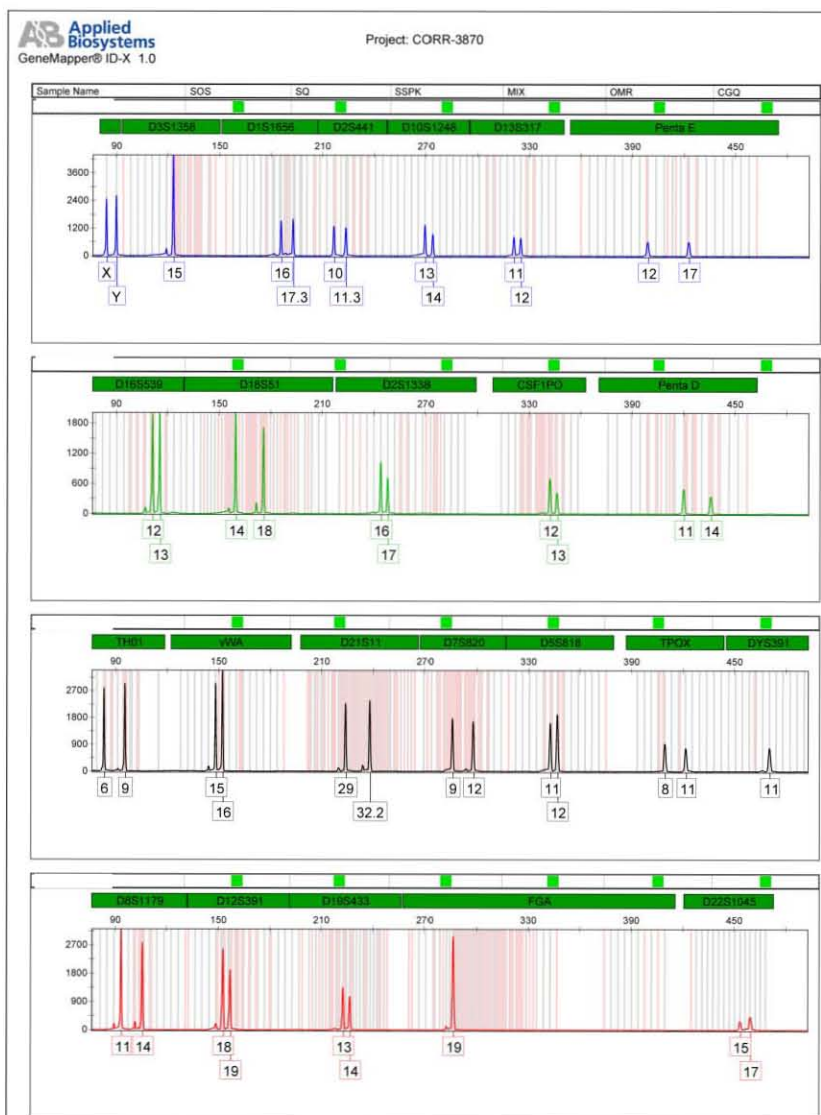


Figura 11. Perfiles genéticos de la muestra 28 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver en estado de putrefacción, específicamente en la fase de licuefacción. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.

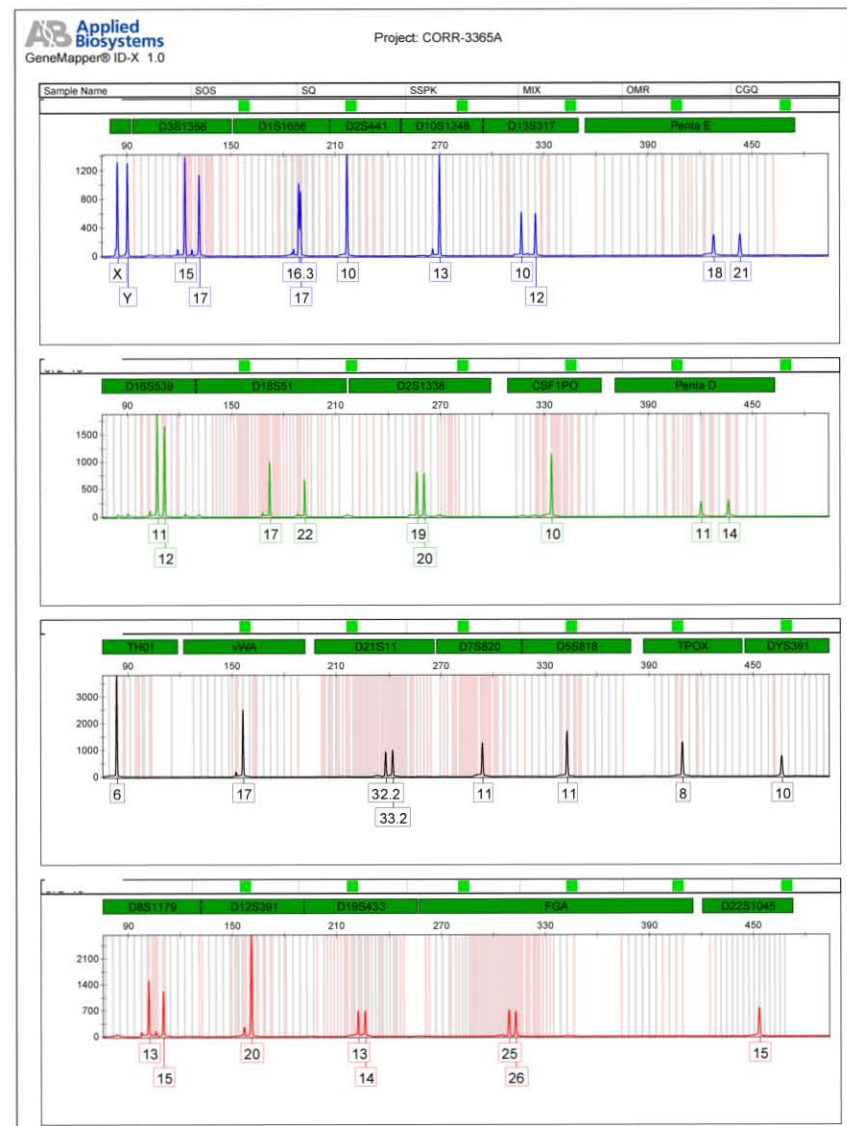
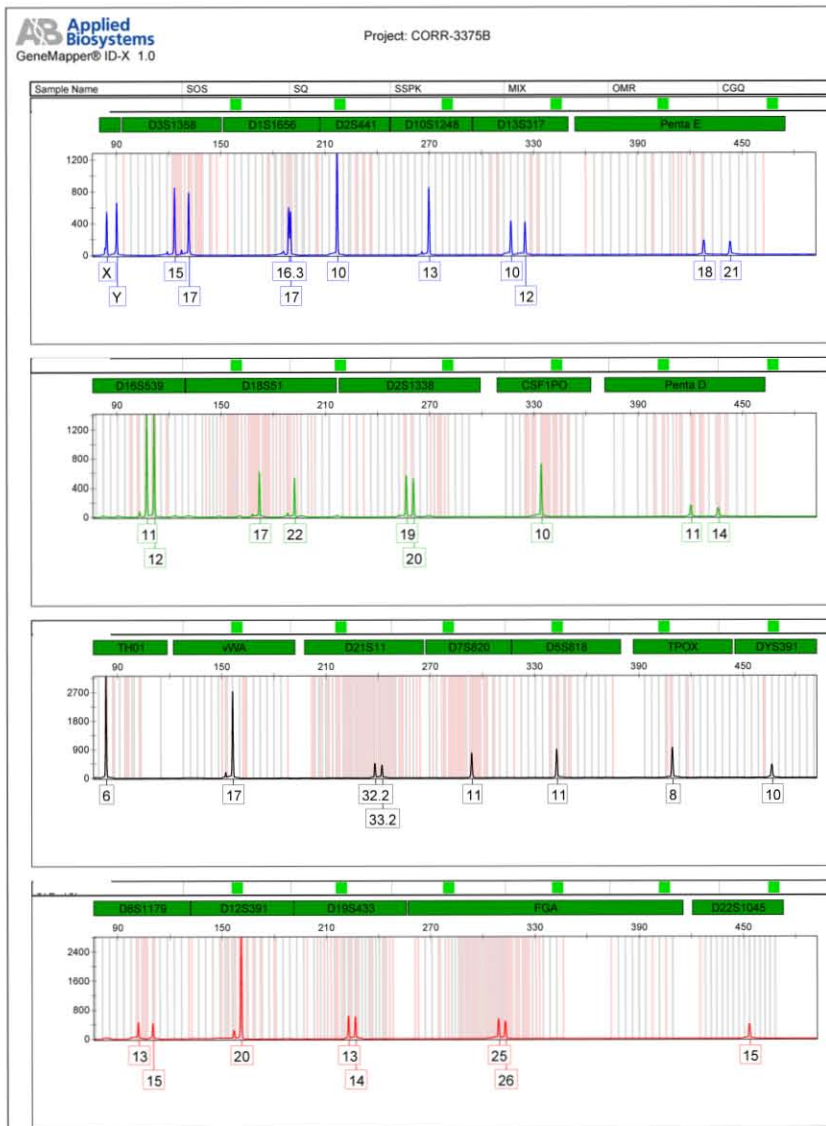


Figura 12. Perfiles genéticos de la muestra 18 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida del único cadáver momificado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.

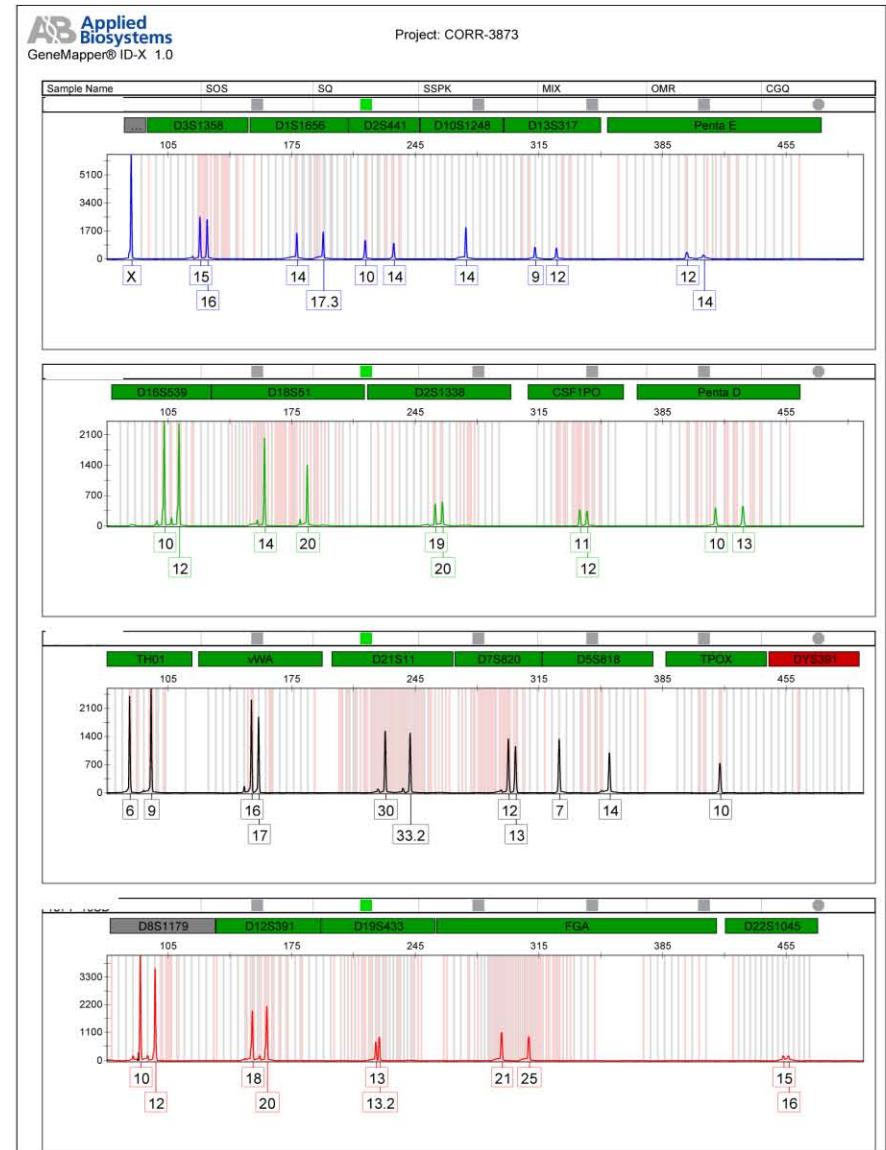
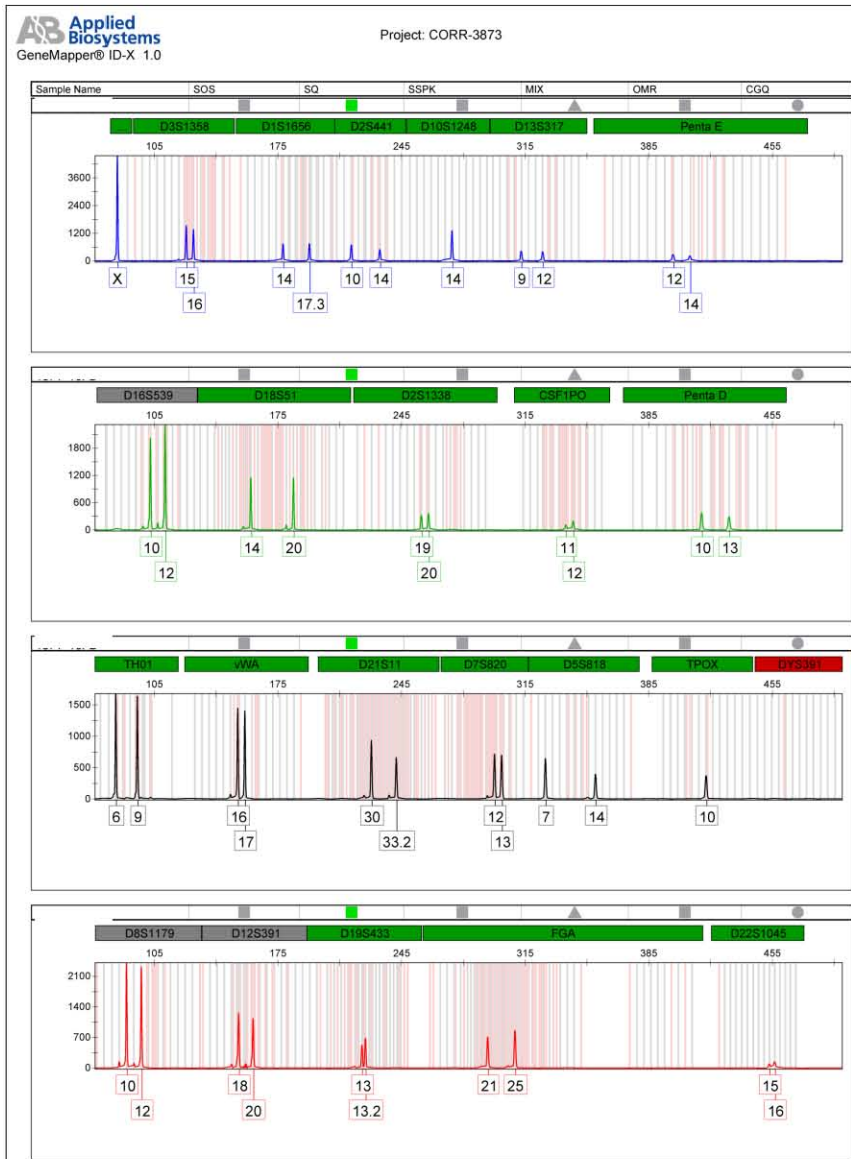


Figura 13. Perfiles genéticos de la muestra 23 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver en estado de saponificación. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Se observa degradación en ambos perfiles genéticos, sin embargo son exitosos para identificación.

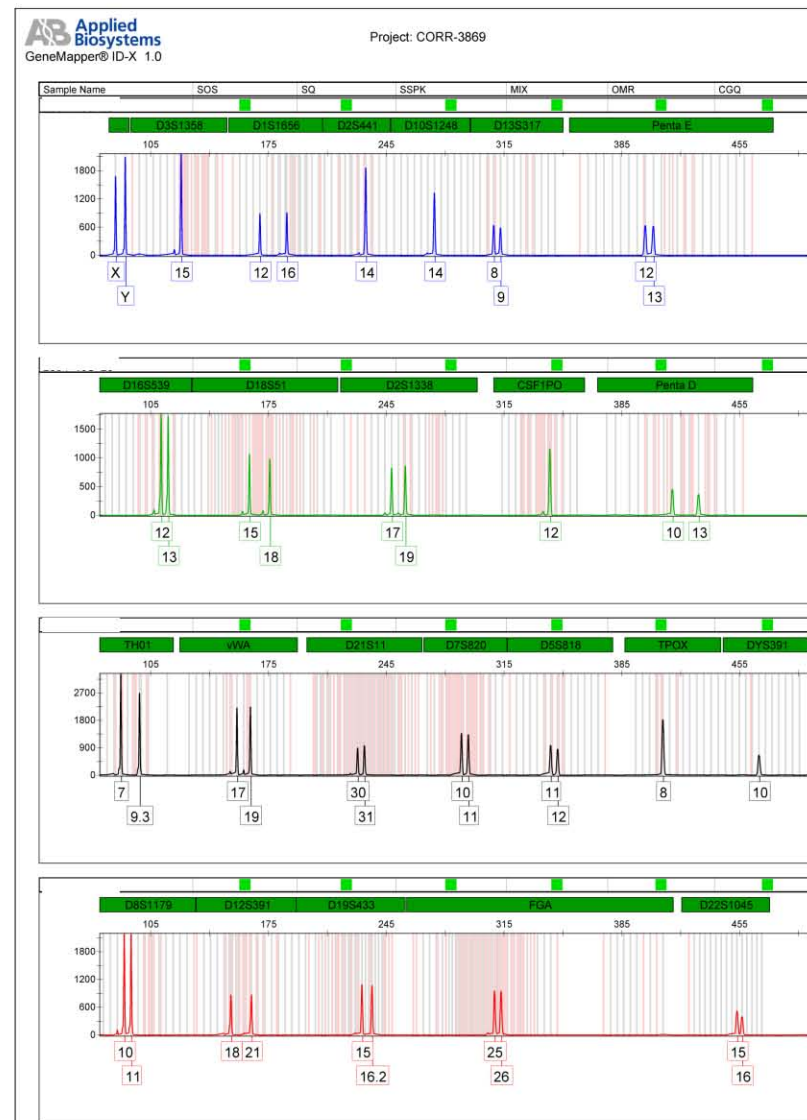
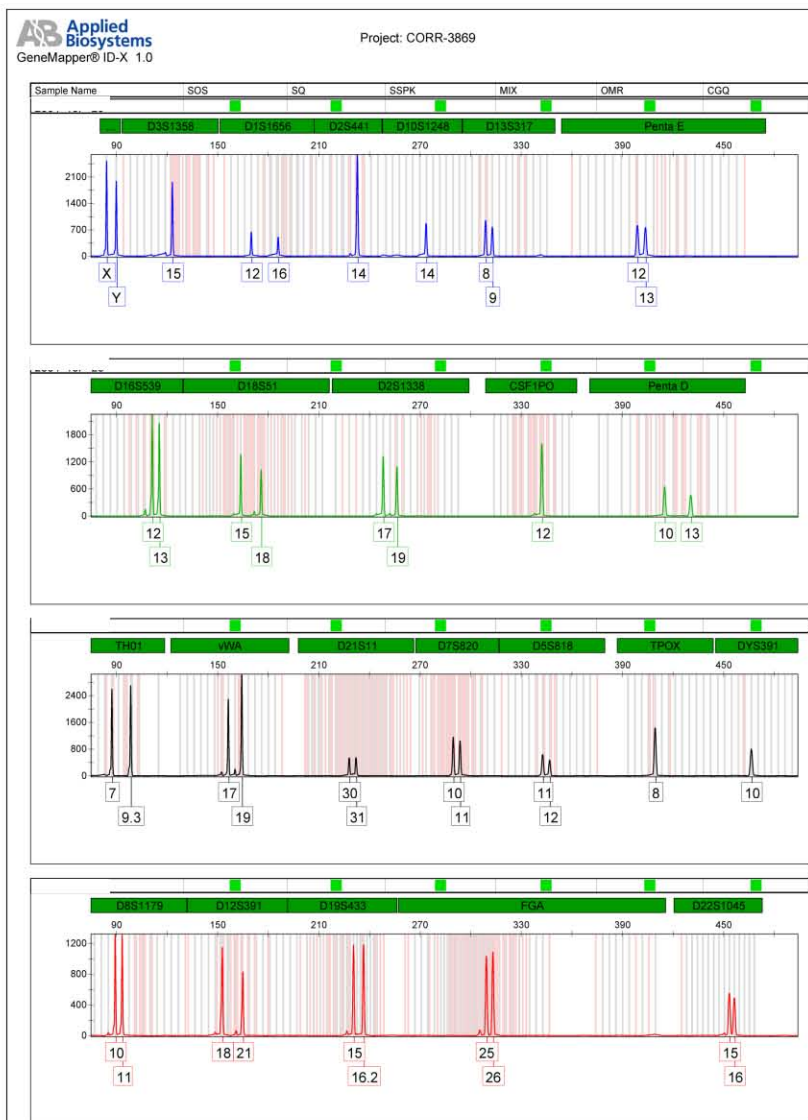


Figura 14. Perfiles genéticos de la muestra 17 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida del único cadáver en estado de corificación. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.

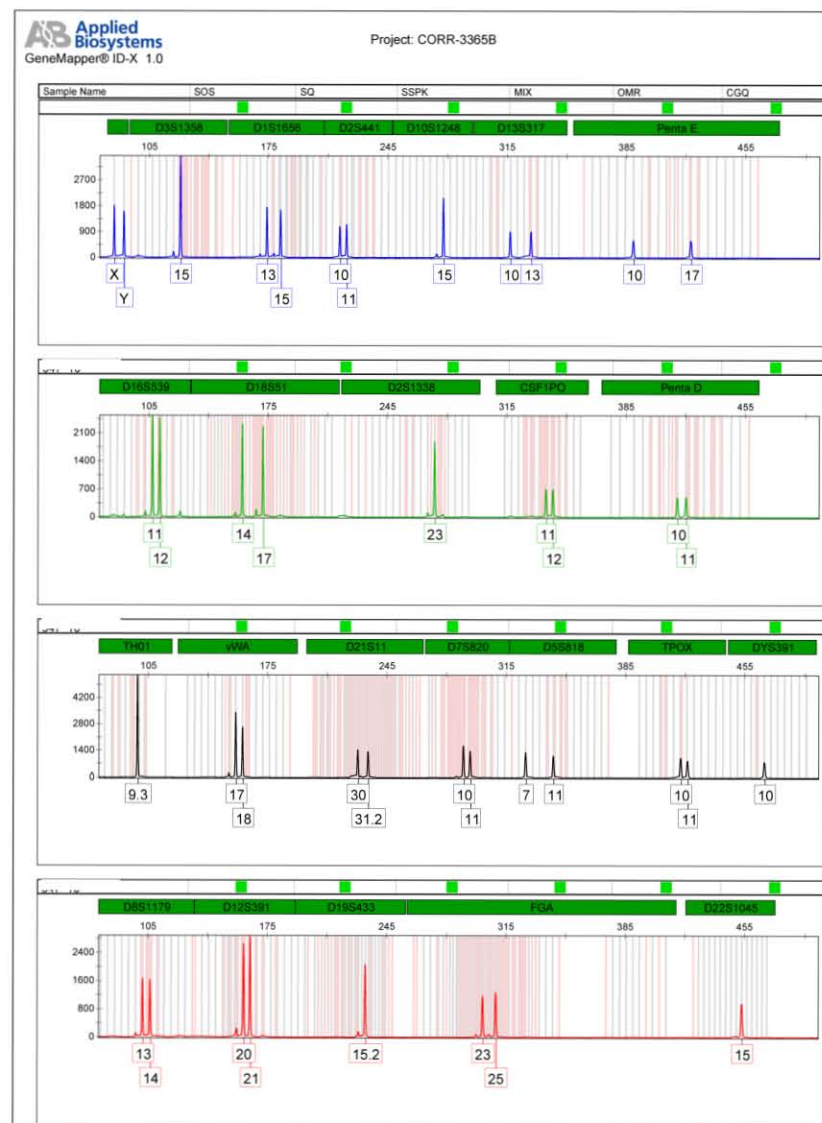
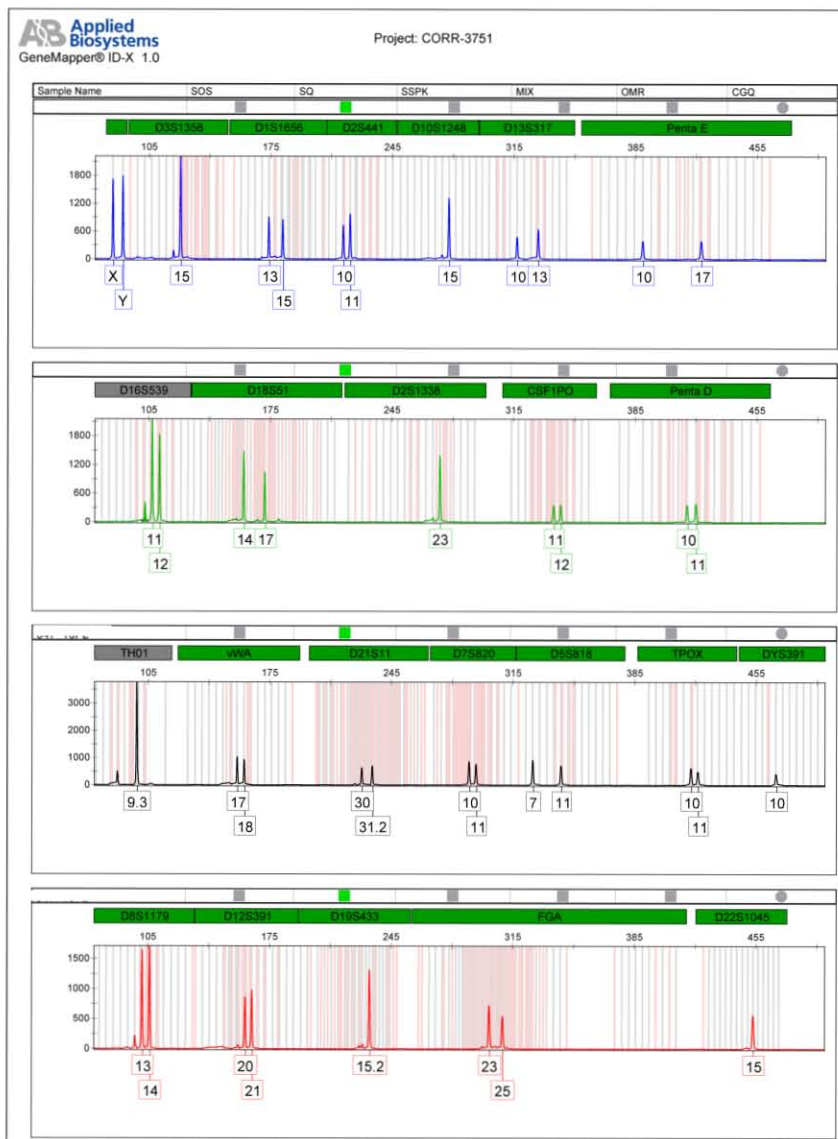


Figura 15. Perfiles genéticos de la muestra 20 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un cadáver carbonizado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Perfiles exitosos para identificación.

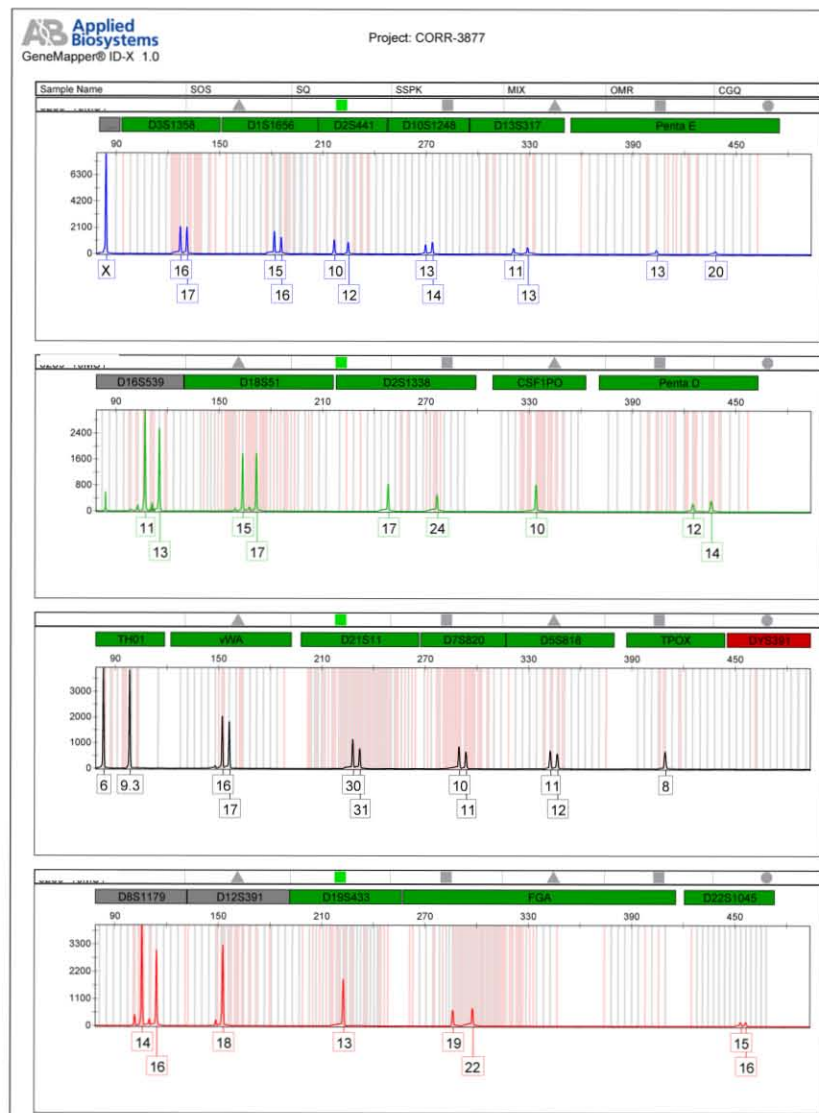
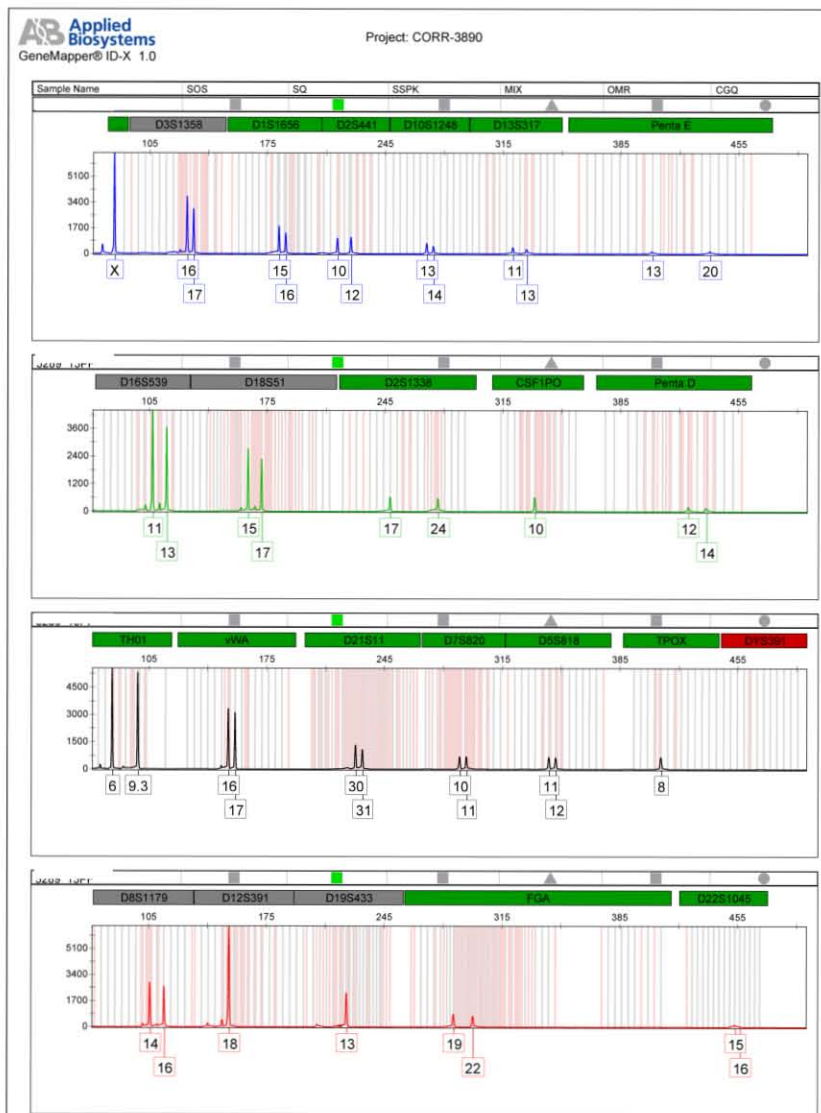


Figura 16. Perfiles genéticos de la muestra 30 con ambos métodos de extracción. Muestra obtenida de un resto humano (pie izquierdo). A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Se observa degradación de DNA, sin embargo son perfiles exitosos para identificación.

Perfiles genéticos de cartílagos distales

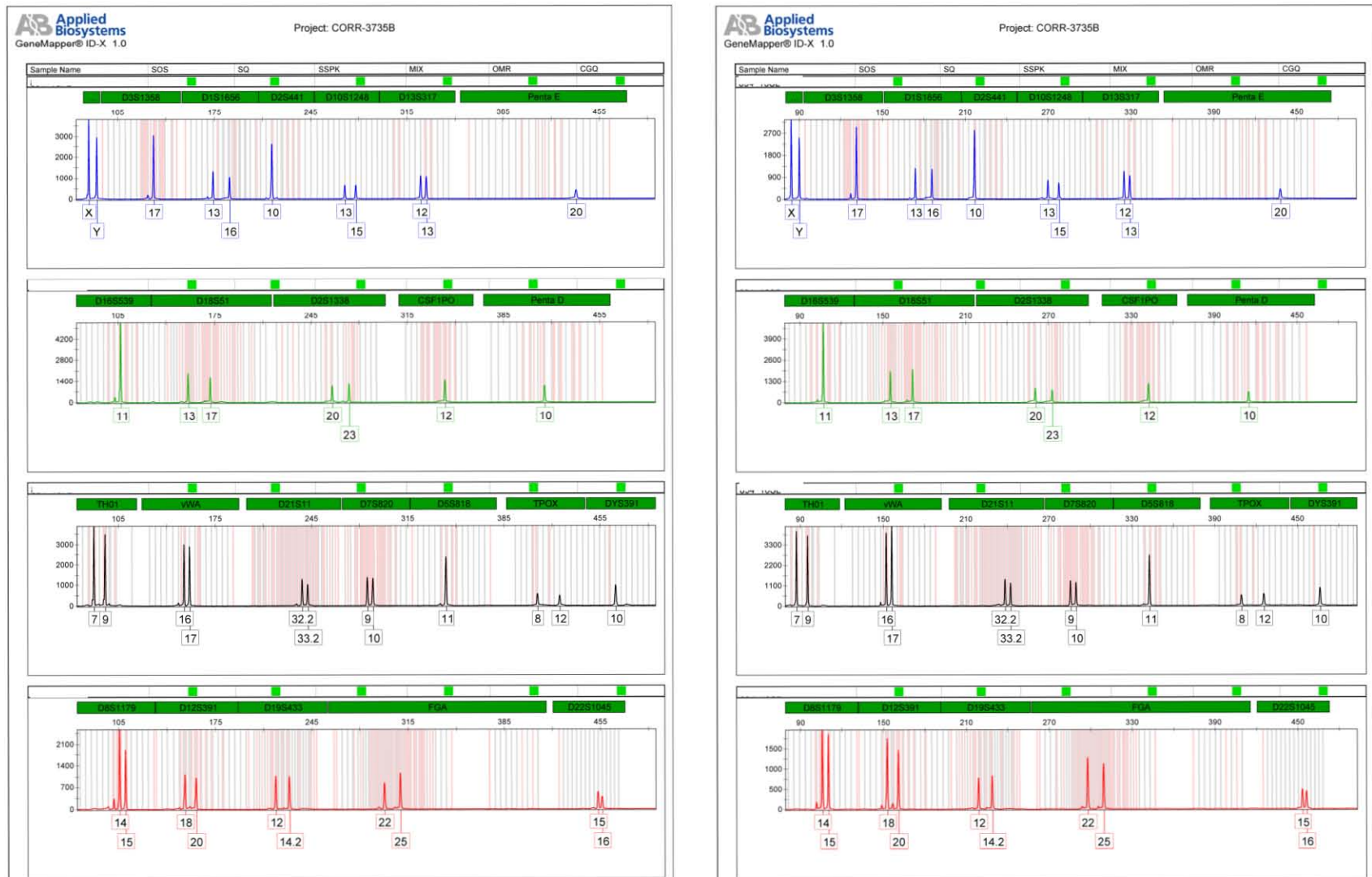


Figura 17. Perfiles genéticos de la muestra 21 con ambos métodos de extracción. Muestras de lajas obtenidas de cadáver carbonizado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. Se observa degradación de DNA, sin embargo son perfiles exitosos para identificación.

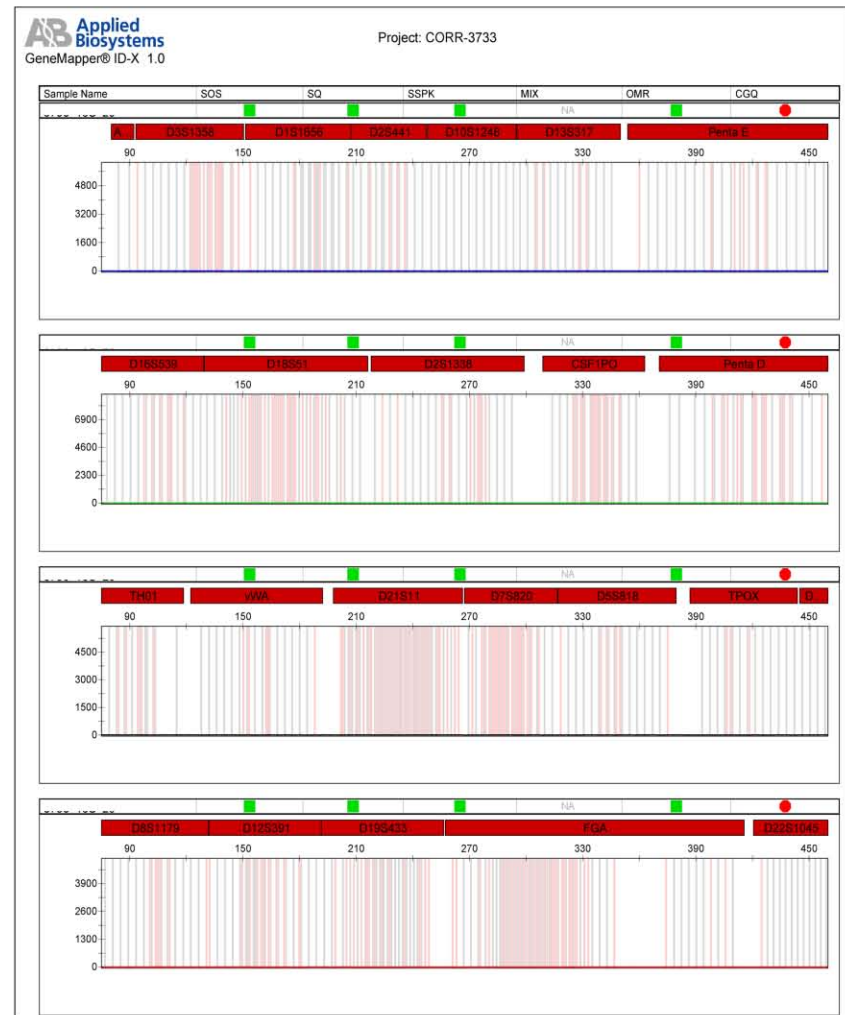
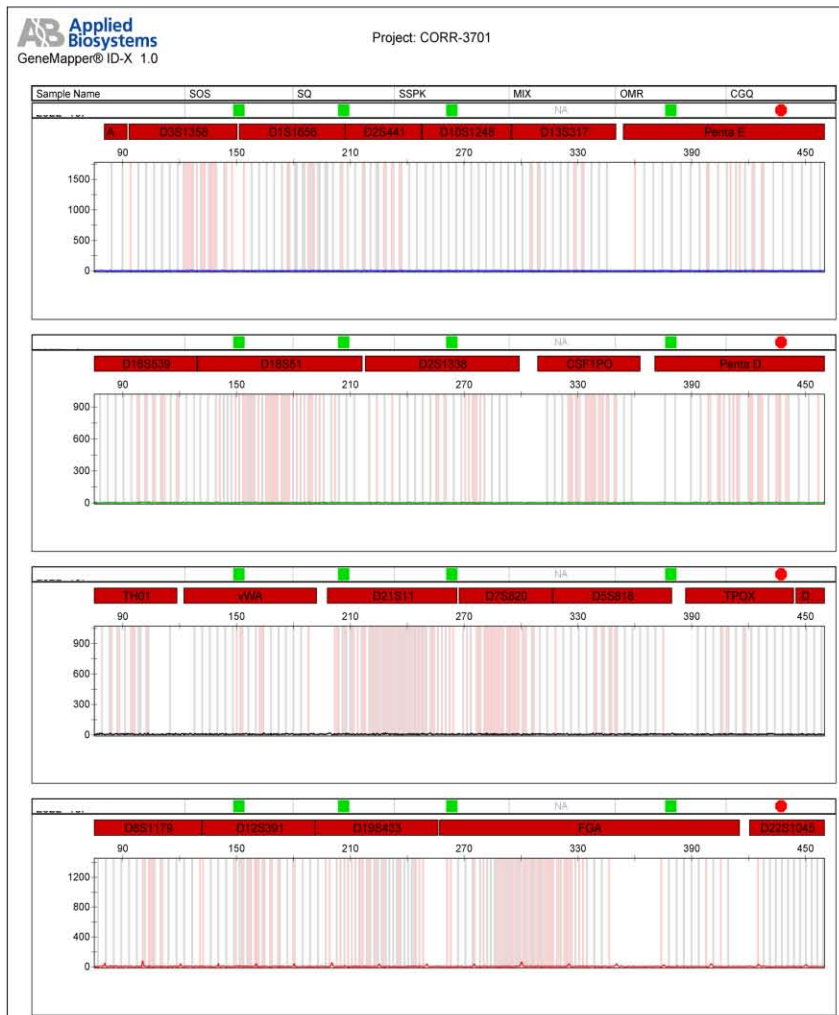


Figura 18. Perfiles genéticos de la muestra 23 con ambos métodos de extracción. Muestras de lajas obtenidas de cadáver saponificado. A la izquierda el perfil obtenido con el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y a la derecha el perfil obtenido con el método de sílica. No se obtuvo ninguno de los marcadores.

Perfiles obtenidos con cada técnica

Tabla 12. Resultados del número de perfiles obtenidos y no obtenidos con cada técnica.

Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	Sílica
Perfiles obtenido: 34	Perfiles obtenidos: 34
Perfiles no obtenidos: 1*	Perfiles no obtenidos: 1*

*El perfil genético que no se obtuvo corresponde al cartílago distal del cadáver 23.

Discusión

Para estandarizar la cantidad necesaria de cartílago en polvo y poder generar un perfil completo se procesaron 3 muestras con 50 mg de DNA obteniendo valores de 11.12 a 17.2 ng/ μ L para las extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y de 11.15 a 16.53 ng/ μ L de DNA para las extracciones con sílica, en ambos casos para un volumen final de 35 μ L. Derivado de estos resultados se decidió disminuir la cantidad de cartílago a 25 mg con intención de obtener DNA en valores dentro de un rango aproximado de 0.5 a 10 ng/ μ L para un volumen final de 35 μ L, el objetivo fue recuperar cantidades sin riesgo de ser potenciales fuentes de contaminación de DNA exógeno, una cantidad mayor de DNA no proporciona ningún beneficio adicional ya que un perfil genético sólo requiere de cantidades que van de 0.25 a 1.0 ng de DNA, lo cual significa que una muestra en concentración de 0.5 ng/ μ L para un volumen final de 35 μ L permitiría realizar hasta 17 ensayos asumiendo que el valor requerido es de 1 ng por reacción de PCR. Por otra parte, una muestra forense bajo resguardo suele ser única debido a que el cadáver o restos humanos al no ser identificados son depositados en una fosa común, por lo que es importante no agotar dicha muestra, ya que se puede necesitar la tipificación con otros sistemas de identificación genética o incluso repetir dicho ensayo.

Por lo que se refiere a los perfiles obtenidos de cadáveres en estado de putrefacción avanzada donde se contemplan los fenómenos cadavéricos enfisematoso, licuefacción, así como el corificado, los alelos de los 24 microsatélites se distinguen perfectamente; respecto a la calidad de los perfiles genéticos con ambos métodos de extracción, la degradación de las muestras es evidente, significando que los procesos de autólisis han comenzado. Esto se observa en la figura 16, donde se aprecia la disminución gradual de izquierda a derecha del tamaño de los alelos, más grandes en los primeros y más pequeños en los últimos.

El perfil genético obtenido del cadáver en estado de momificación permite determinar que éste tipo de muestras son exitosas para llevar a cabo estudios de identificación humana, logrando obtener los 24 microsatélites STR's que integran el sistema PowerPlex Fusion, con una buena calidad. Con ninguna de las dos técnicas se observa degradación de tejido cartilaginoso, esto puede explicarse ya que para que un cadáver se momifique de manera natural, se necesita un ambiente seco, lo que causa la deshidratación de todos los tejidos. Esta deshidratación no permite que las enzimas, principalmente DNAsas, actúen degradando el material genético, además de que el tejido se deshidrata tan rápido que se pega directamente al cartílago, protegiéndolo de posibles contaminantes del suelo y ambientales.

En el caso de las muestras tomadas de individuos saponificados, la degradación del DNA se debe a las características del medio en que se encontró sumergido el cadáver. Como se mencionó este tipo de fenómeno cadavérico requiere de agua, favoreciendo que las bacterias metabolicen e inicien la formación de la capa de grasa, por lo que el medio acuático permite el arrastre de contaminantes por difusión al tejido cartilaginoso, provocando también que se pierda una gran cantidad de material genético en el proceso. Ejemplo de ello se manifiesta en la muestra 23 debido a que este cadáver carecía de extremidades inferiores y superiores, permitiendo un infiltrado mayor de contaminantes. Sin embargo, fue posible obtener los perfiles genéticos completos de las muestras de cadáveres saponificados pero evidentemente se observa la degradación del DNA, como se advierte en los electroferogramas (figura 13) donde hay una disminución de izquierda a derecha del tamaño de los alelos.

Con relación a la muestra de cartílago distal del cadáver saponificado número 23, no se obtuvo DNA suficiente (0.01 ng/ μ L), para generar un perfil genético con 12.5 mg de cartílago en polvo, lo anterior podría explicarse por la baja cantidad empleada de muestra y principalmente porque los cartílagos distales se encontraban completamente expuestos al ambiente, lo que provocó su rápida degradación (Figura 18). Respecto al cartílago costal, si fue posible obtener un perfil genético completo a pesar del mal estado de conservación del cadáver, cabe resaltar que esto fue debido a que los cartílagos costales estaban protegidos por el músculo y la piel lo que permitió que no estuvieran en contacto directo con aguas residuales. En cuanto a la calidad del perfil, se puede observar que la altura de los alelos de los marcadores pequeños como THO1, Amelogenina, D8S1179 y D3S1358 son muy grandes y en contraste la altura de los alelos de los marcadores más grandes como Penta E, Penta D y D22S1045 que son muy pequeños, evidenciando la degradación del DNA de la muestra.

Los perfiles genéticos de los cadáveres carbonizados o calcinados no muestran signos de degradación como los perfiles obtenidos de las muestras de cadáveres saponificados (Figura 15 y 17), esto se debe a que durante la toma de la muestra correspondiente se procura seleccionar el sitio que estuvo menos expuesto al fuego, aunque en ocasiones todo el cadáver está completamente calcinado y los cartílagos costales han desaparecido siendo necesario retirar el músculo de las articulaciones para poder acceder a los cartílagos distales. Cabe mencionar que se obtuvieron los perfiles tanto de cartílagos costales y distales de los 4 cadáveres calcinados, comprobando que 12.5 mg de cartílago en polvo son suficientes para generar un perfil genético completo y sin evidencia de degradación.

El daño por altas temperaturas en la piel y en huesos es evidente, sin embargo, el cartílago sigue presentando la característica coloración indicando que los

procesos de putrefacción aún no han comenzado. La cantidad de DNA obtenida en cartílagos distales es similar a la del cartílago costal, asimismo se obtuvieron perfiles completos con ambas técnicas.

Es importante mencionar que se realizó la toma de muestras de cartílago en regiones distales para demostrar que, en primera instancia, se puede utilizar cartílago de todas las regiones anatómicas y aun así el resultado seguirá siendo el mismo y por otra parte determinar que ambas técnicas son efectivas con este tipo de muestras.

En el caso de restos humanos (pie izquierdo), la muestra analizada se tomó del cartílago adherido a la tróclea del astrágalo, ésta es una de las dos muestras más degradadas que se incluyeron en el estudio, ya que los restos fueron localizados en un canal de aguas negras, aun así fue posible obtener el perfil genético completo con ambas técnicas de extracción, no obstante, la calidad del perfil genético se ve afectada por la degradación de la muestra (Figura 16), en donde se observa la disminución gradual del tamaño de izquierda a derecha de los alelos, más grandes en los primeros marcadores y más pequeños en los últimos marcadores.

La razón de emplear una prueba no paramétrica se debe a que los datos no presentan una distribución normal, y se eligió la prueba de U de Mann-Whitney como una prueba análoga a la prueba estadística paramétrica T-student, la cual se utiliza para demostrar si hay diferencias significativas entre las medias de una población. En este caso se compararon los promedios de DNA obtenidos con ambos métodos y mediante el valor P la prueba estadística afirma que no hay diferencias significativas en el promedio obtenido, lo que se traduce en que ambos métodos Sílica y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico se pueden utilizar indistintamente para la extracción de DNA de cartílago de muestras provenientes de cadáveres y restos altamente degradados para la generación de un perfil genético, independientemente del estado en que es recuperado un cadáver, sea putrefacción tardía, fase enfisematosa, licuefacción, saponificación, corificación, momificación o calcinados. Las técnicas de extracción aplicadas han permitido comprobar ser procedimientos que se desarrollan de una manera rápida en comparación con el procesamiento de una muestra de tejido óseo. En cuanto a tiempo, la extracción con sílica tarda 25 minutos en comparación de la extracción orgánica que tarda 45 minutos.

Conclusiones

Se realizó la estandarización de las técnicas de extracción mediante el empleo de fenol cloroformo alcohol isoamílico y sílica, determinando que la cantidad idónea de polvo de cartílago costal necesaria para la obtención de un perfil genético con el sistema PowerPlex® Fusion que consiste de 24 microsatélites, es de 25 mg.

Se realizó la estandarización de las técnicas de extracción mediante el empleo de fenol cloroformo alcohol isoamílico y sílica, determinando que la cantidad mínima requerida de polvo de cartílago distal para generar un perfil genético con el sistema PowerPlex® Fusion que consiste de 24 microsatélites, es de 12.5 mg.

Los resultados obtenidos para las 30 muestras analizadas, demostraron que el cartílago costal y distal proveniente de cadáveres con fenómenos tardíos y tardíos conservadores como licuefacción, enfisematoso, saponificación, corificación, momificación, calcinación, así como en restos humanos degradados, son una excelente alternativa para la obtención de DNA y en consecuencia para la obtención de perfiles genéticos útiles para su identificación posterior.

La prueba estadística determinó que no existen diferencias significativas ($P=0.1958$) respecto al promedio de DNA obtenido con cada una de las técnicas de extracción, por lo tanto pueden ser utilizadas indistintamente para la extracción de DNA de cartílago costal y distal.

Con relación a la calidad de los perfiles genéticos generados, se observa algún grado de degradación del DNA, derivado del tipo de muestras analizadas, sin embargo, son perfectamente interpretables los 24 microsatélites que integran el sistema PowerPlex® Fusion, de tal manera que pueden ser empleados para realizar una futura identificación. Los únicos que no presentan una degradación evidente son los perfiles genéticos de cadáveres carbonizados ni el cadáver momificado.

No fue posible obtener el perfil genético de una muestra de cartílago distal debido a la degradación del DNA, por lo que se sugiere el empleo de otros sistemas genéticos como mini STR's, InDel's o DNA mitocondrial, con la finalidad de contar con alguna información que permita al menos incluir o excluir a un individuo como posible familiar de la persona a identificar.

Tomando en cuenta los resultados del presente estudio se propone la implementación en el laboratorio de genética del INCIFO del método de extracción de DNA por medio de sílica a partir de muestras de cartílago de cadáveres y restos altamente degradados, ya que es rápido y no implica el manejo de reactivos tóxicos, lo anterior con el objetivo principal de complementar la base de datos genéticos de personas desconocidas.

Literatura citada

Alaeddini, R. (2012). *Forensic implications of PCR inhibition- A review*. Forensic Science International: Genetics. 6: 297-305.

Aleaddini, R., Walsh, S., Abbas, A. (2010). Forensic implication of genetic analyses from degraded DNA- A review. Forensic Science International: Genetics. 4: 148-157.

Alberts, B., Jonhson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell 6th edition*. Garland Science: Taylos & Francis Group. UK.

Amendt, J., Goff, M., Campobasso, C., Grassberger, M. (2010). *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer Press. New York. USA.

Arya, M., Shergill, I., Williamson, M., Gommersall, L., Patel, R. (2005). *Basic Principles of Real-Time quantitative PCR*. Expert Review of Molecular Diagnostics. 5(2). 1-11.

Ata-Ali, J. (2014). *Forensic dentistry in human identification: A review of the literature*. Journal section: oral Medicine and Pathology. 6(2):e162-7

Bessetti, J. (2007). *An Introduction to PCR Inhibitors*. Publicado por Promega Corporation. Disponible en www.promega.com

Bolton, S. (2014). *Forensic Taphonomy: Investigating the post mortem Biochemical Properties of Cartilage and Fungal Succession as Potential Forensic Tools*. University of Wolverhampton. England.

Bolton, S., Whitehead, M., Dudhia, J., Baldwin, T., Sutton, R.. (2015). *Investigating the post mortem Molecular Biology of Cartilage and its Potencial Forensic Applications*. Journal of Forensic Sciences. 60(4): 1061-1067.

Budowle, B., Allard, M., Wilson, M., Chakraborty, R. (2003). *Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations*. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 4: 119-141.

Butler, J. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA typing*. 1st edition, USA: Academic Press, Elsevier

Bluter, J. (2006). *Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci used in Human Identity Testing*. Journal of Forensic Science. 51 (2).

Bluter, J., Coble, M. (2007). *STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing*. Forensic Science, Medicine and Pathology. 3:200-205.

- Buttler, J. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. USA: Academic Press, Elsevier.
- Bhanwer, A., Sigh, A., Sigh, J. (2001). *DNA fingerprinting in Forensic and Medico-Legal Applications*. JPAFMAT. 1: 22-29.
- Budowle, B., Van Daal. A.(2008). *Forensically relevant SNP classes*. BioTechniques Review. 44:603-610.
- Carey, L., Mitnik, L. (2002). *Review: Trends in DNA forensic analysis*. Electrophoresis. 23: 1386-1397.
- Carracedo, A. (2005). *Forensic DNA Typing Protocol*. New Jersey: Humana Press. USA.
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Sokol, R. (2006). *DNA Extraction Methods in Forensic Analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons.
- Chen, K. 2012. *Microsatellite DNA: Population Genetics and Forensic Applications*. Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education. 3: 8-30.
- Coble, M., Butler, J. (2005). *Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA*. Journal of Forensic Science. 20 (1).
- Coble, M. (2009). *An Improved Bone Extraction Protocol at AFDIL*. 1st Course of Forensic Genetics and Molecular Anthropology. Mexico City, Mexico.
- Constantines, C., Barbari, L., Iancu, C., Neagu, E., Iancu, D., Girbea, G. (2012). *Challenging DNA samples solved with MiniSTR analysis: Brief overview*. Romanian society of Legal Medicine. 20(1): 51-56.
- Deaton, S. (2015). *Optimization of a method for the extraction of DNA from human skeletal remains for forensic Casework*. Western Carolina University. USA.
- Diegoli, T., Coble, M. (2015). *Characterization of X chromosomal Short Tandem Repeat Markers for Forensic Use*. Final Technical Report. National Institute of Justice. USA.
- Donaldson, A., Lamont. I. (2013). *Estimation of post mortem interval using biochemical markers*. Australian Journal of Forensic Sciences. 46(1):1-19
- Estrada, E., Uribe, M. (2002). *Atlas de histología de vertebrados*. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Fan, H., Chu J. (2007). *A brief review of short tandem repeat mutation*. Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 5(1).

- Fiedler, S., Graw, M. (2003). *Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere*. *Naturwissenschaften*. 90(7): 291-300
- Filho, A., Ferreira, S., Oliveira, S. (2013). *Impact of a chromosome X STRDecaplex in deficiency paternity cases*. *Genetics and Molecular Biology*. 36(4): 507-510
- García, J. (2015). *Tanalogía medicoforense: la fragilidad de la existencia humana*. Editorial Trillas, México.
- Gino, S., Robino, C., Bonnano, E., Torre, C. (2003). *DNA typing from epiglottic cartilage on exhumed bodies*. *International Congress Series*. 1239: 885-997
- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. John Wiley & Sons. England.
- Gupta, M., Jain, G. (2011). *Case Report: Importance of Adipocere in Determining the Cause of Death*. *Journal of Indian Academic Forensic Medicine*. 33(3):269-270.
- Hammer, M., Chamberlain, V., Kearney V., Stover, D., Zhang, G., Karafet, T., Walsh, B., Redd, A. 2005. *Population structure of Y chromosome SNP haplogroups in the United States and forensic implications for constructing Y chromosome STR databases*. *Forensic Science International*.
- Ishmael, F., Stellato, C. (2008). *Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for practicing physician*. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 101: 437-443
- Jakubowska, J., Maciejewska, A., Pawlowski, R. (2012). *Comparison of three methods of DNA etaction from human bones with different degrees of degradation*. *International Journal of Legal Medicine*. 126: 173-178
- Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S. (1985). *Individual-specific "fingerprints" of human DNA* . *Nature*. 316: 76-79
- Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S. (1985). *Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA*. *Nature* 314: 67-73
- Jobling, M.A., Gill, P. (2004). *Encoded evidence: DNA in forensics analysis*. *Nature Reviews Genetics*. 5:739-751.
- Karni, M., Polak, P., Zalevsky, Z., Shefi, O. (2013). *Thermal Degradation of DNA*. *DNA and Cell Biology*. 32(6).
- Kayser, M., Kniff, P. (2011). *Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology*. *Nature Reviews: Genetics*. 12: 179-192

Kayser, M., Sajantila, A. 2001. *Mutations at Y-STRloci: implications for paternity testing and forensic analysis*. Forensic Science International. 118: 116-121.

Knight, J. (2009). *Human Genetic Diversity: Funcional consequences for Health and Disease*. Oxford University Press. USA.

Levitt, M. (2007). *Forensic databases: benefits and ethical and social costs*. British Medical Bulletin. 83:235-248.

Loreille, O., Diegoli, T., Irwin, J., Coble, M., Parsons, T. (2007). *High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization*. Forensic Science international: genetics. 1:191-195

McCord, B., Pionzio, A., Thompson, R. (2015). *Analysis of the Effect of a Variety pf PCR Inhibitors on the Amplification of DNA using Real Time PCR, Metl curves and STR Analysis*. Publicado por U.S Department of Justice. USA.

Melton, T., Holland, C., Holland, M. (2012). *Forensic Mitochondrial DNA analysis: Current Practice and Future Potencial*. Forensic Science Review. 24(2). 103-122.

Mulero, J., Chang, C., Legacé, R., Wang, D., Bas, J., Mahon, T., Hennesy, L. (2008). *Development and Validations of the AmFISTR Minifiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR inhibited DNA*. Journal of forensic Science. 53(4).

Nelson, D., Cox, M. (2009). *Lehninger, Principios de Bioquímica 5ta edición*. W.H Freeman and Company. Barcelona.

Oostdik, D., Lenz, K., Nye, J., Schelling, K., Yet, D., Bruski, S., Strong, J., Buchanan, C., Sutton, J., Linner, J., Frazier, N., Young, H., Matthies, L., Sage, A., Hagn, J., Wells, R., Williams, N., Price, M., Koehler, J., Staples, M., Swango, K., Hill, C., Oyerly, K., Duke, W., Katzilierakis, L., Ensenberger, M., Bourdeau, J., Sprecher, C., Krenke, B., Storts, D. (2014). *Developmental validation of the PowerPlex® Fusion System for analysis of casework and reference samples: A 24-locus multiplex for new database standars*. Forensic Science International: Genetics. 12: 69-76.

Pinheiro, J., Schmitt, A., Cunha, E. (2006). *Decay Process of a Cadaver*. Forensic Anthropology and Medicine: Complementary Sciences from Recovery to Cause of Death. Huamana Press Inc, Towota, NJ. USA

Primorac, D., Schanfield, M. (2014). *Forensic DNA Applications: An interdisciplinary perspective*. CRC Press Taylos & Francis Group. USA.

Rapley, R., Whitehouse, D. (2007). *Molecular Forensics*. Jonh Wiley & Sons. England.

Rich, J., Dean, D., Powers, R. (2005). *Forensic Medicine of the Lower Extremity*. Human Press Inc. Totowa, NJ. USA

Rohland N., Hofreiter M. (2007). *Comparison and optimization of ancient DNA extraction*. *BioTechniques* 42:343-352

Rohland N., Hofreiter M. 2007. *Supplementary Material For: Comparison and optimization of ancient DNA extraction*. *BioTechniques* 42:343-352

Rogers, C., Clark, K., Hodson, B., Whitehead, M. (2011). *Post mortem degradation of porcine articular cartilage*. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 18: 52-56

Robertson, J., Ross, M., Burgoyne, L. (2002). *DNA in forensic Science: Theory, Techniques and Applications*. Ellis Horwood Limited. England.

Rodríguez, R., Castañeda, A., Ordaz, M. (2009). *Conceptos Básicos de Genética 2ª edición*. Las prensas de Ciencias. UNAM. México.

Roewer, L. (2013). *DNA fingerprinting in forensics: past, present, future*. *Roewer Investigative Genetics*. 4:22

Ross, M., Pawlina, W.(2006). *Histología, Texto y Atlas Color con biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana 5ª edición. Buenos Aires. Argentina.

Roughley, P. (2006). *The structure and function of Cartilage Proteoglycans*. *European Cells and Materials*. 12: 92-101.

Sales, A., Alves, R., Lopes, C., Maciel, S. (2006). *Forensic thanatology: biological and legal aspects*. *Brazil Journal of Oral Sciences*. 5(19):1198-1102

Sánchez, J., Robledo, M. (2009). *Cadáveres quemados. Estudio antropológico-forense*. *Cuadernos de Medicina Forense*. 14: 53-54.

Santos, F., Hachado, H., Silva, S. (2013) *Forensic DNA databases in European countries: is size linked to performance?*. *Life Science, Society and Policy*.9:12

Schon, E. Hirano, M. (2012). *Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations*. *Nature Reviews*.13: 887-890.

Shulze, H., Kolter, T., Sandhoff, K. (2009). *Principles of lysosomal membrane degradation. Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793. 674-683.

- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., Goswami, A. (2014). *A critical review on PCR, it's types and applications*. International Journal of advanced Research in Biological Sciences. 1(7): 65-80.
- Sobrino, B., Brión, M., Carracedo, A. (2005). *SNPs in forensics genetics: a review on SNP typing methodologies*. Forensic Science International. 154: 181-194.
- Stanojevich, V. (2012). *The role of Forensic Anthropologist in a Death Investigation*. Journal of Forensic Research. 3:154.
- Strachan, T., Read, A. (2004). *Human Molecular Genetics 4th edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group. UK.
- Tan, S., Yiap, B. (2009). *DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present*. Journal of Biomedicine and Biotechnology: 1-10
- Timken, M., Swango, K., Orrego, C., Chong, M. (2005). *Quantification of DNA for Forensic DNA typing by qPCR*. Published by US. Department of Justice. USA.
- Ubelaker, D., Zarenko, K. (2011). *Adipocere: What is known after over two centuries of research*. Forensic Science International. 208: 167-172.
- Ubelaker, D. (2008). *The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis*. Forensic Science International. 183(1-3):1-5
- Vass, A. (2001). *Beyond the grave: understanding human decomposition*. Microbiology Today. 28(1): 190-192
- Vergnaud, G., Denoeud, F. (2000). *Minisatellites: Mutability and Genome Architecture*. Genome Research. 10(7): 889-907.
- Welsch, U. (2006). *Histología*. Editorial Médica Panamericana 2ª edición. Buenos Aires. Argentina
- Willems, T., Gymrek, M., Highnam, G., Mittelman, D., Erlich. (2014). *The landscape of human STR variation*. Genome Research. 24: 1894-1904.
- Witas, H., Zawicki, P. (2004). *Mitochondrial DNA and human evolution: A review*. Anthropology Reviews. 67:97-110.
- Wright, A. (2005). *Genetic Variation: Polymorphism and Mutations*. Encyclopedia of life Sciences, Jonh Wiley & Sons.
- Wurm-Schwark, N., Petermann, S., Wegener, R. (2003). *Y-STR tying in forensic analysis*. International Congres Series. 1239: 487-490.

Wurm-Schwark, N., Heinrich, A., Freudenberg, M., Gebuhr, M., Schwark, T. (2008). *The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research*. Legal Medicine. 10: 125-130

Ye, J., Ji, A., Parra, E., Zheng, X., Jiang, C., Zhao, X., Hu, K., Tu, Z. (2004). *A simple and Efficient Method for Extracting DNA from old and burned bone*. Journal of Forensic Science. 48(4).

Yoon, S. (2014). *Fingerprint Recognition: Models and Applications*. Submitted to Michigan State University for the degree of Doctor of Philosophy.

Zidkova, A., Horinek, A., Kebrdlova, V., Korabecna, M. (2013). *Application of the new insertion-deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech population*. International Journal of Legal Medicine. 127: 7-10.

Disponible en web

Federal Bureau of Investigation. (2016). *Combined DNA Index System (CODIS)*. [online] Disponible en: <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>.

El Universal. (2016). *DF: Más de 2 mil muertos están sin identificar*. [online] Disponible en: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/periodismo-de-datos/2015/09/6/df-mas-de-2-mil-muertos-estan-sin-identificar>.

SIPSE, G. (2016). *TSJDF: en 8 años, 3 mil cadáveres sin identificar en México*. [online] sipse.com. Disponible en: <http://sipse.com/mexico/cadaveres-distrito-federal-ciudad-mexico-cuerpos-fosas-180668.html>.

El Universal. (2016). *Anuncian registro de muertos no identificados*. [online] Disponible en: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/metropoli/cdmx/2016/09/7/anuncian-registro-de-muertos-no-identificados>.

Federal Bureau of Investigation. (2016). *CODIS - NDIS Statistics*. [online] Disponible en: <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis/ndis-statistics>.

Promega (2016). *Power Plex® Fusion Systems*. [online] Disponible en: <https://worldwide.promega.com/products/genetic-identity/str-amplification/powerplex-fusion-str-kits/?tabset0=0>

Anexo

Preparación de sílica (tomado de **Rohland N. and Hofreiter M. 2007** *Supplementary Material*)

4.8 g de sílica se suspenden en H₂O dd (destilada y desionizada) en un volumen final de 40 ml. Después de la sedimentación durante 1 hora, 39 ml son trasferidos a un nuevo tubo y puestos a reposar por 4 horas más. Posteriormente 35 ml del sobrenadante son retirados y 48 µl de HCl al 30% se añaden a la fracción sedimentada con el fin de ajustar el pH. Después la suspensión de sílica se divide en alícuotas de 400 µl las cuales se almacena en el refrigerador.