



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE BIOMARCADORES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES
GENÉTICAS DE UTILIDAD FORENSE**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ZETZIN BIAANI BELTRÁN FLORES

CDMX.

Noviembre

AÑO 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

VOCAL: Profesor: Alejandra Quijano Mateos

SECRETARIO: Profesor: Alexa Villavicencio Queijeiro

1er. SUPLENTE: Profesor: Paulina del Valle Pérez

2° SUPLENTE: Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE,
LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE. FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Alexa Villavicencio Queijeiro

SUSTENTANTE (S):

Zetzin Biaani Beltrán Flores

| | |
|---|----|
| Índice | |
| Resumen..... | 9 |
| Introducción..... | 10 |
| Planteamiento del problema..... | 11 |
| Objetivos..... | 12 |
| Metodología..... | 13 |
| Capítulo 1. Conceptos generales de biología molecular..... | 14 |
| 1.1 El ADN como material genético y hereditario..... | 14 |
| 1.2 Ciclo celular..... | 15 |
| 1.3 El ácido desoxirribonucleico (ADN)..... | 17 |
| Capítulo 2. El Genoma..... | 19 |
| 2.1 Organización del ADN dentro de la célula: Cromosomas y cariotipo..... | 21 |
| 2.2 ADN mitocondrial..... | 24 |
| 2.2.1 Homo- y Heteroplasmía..... | 26 |
| 2.3 Cromosoma Y..... | 26 |
| Capítulo 3. Variabilidad genética: mutaciones y polimorfismos..... | 27 |
| 3.1 Polimorfismo de Repeticiones Cortas en Tándem (STR)..... | 29 |
| 3.2 Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)..... | 30 |
| Capítulo 4. Técnicas de manipulación de ADN forense..... | 33 |
| 4.1 Enzimas de restricción..... | 34 |
| 4.2 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)..... | 34 |
| 4.3 Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP)..... | 35 |
| 4.5 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs)..... | 35 |
| 4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 36 |
| 4.7 Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)..... | 40 |
| 4.8 Secuenciación de siguiente generación (NGS)..... | 42 |
| Capítulo 5. Las omicas relacionadas con la ciencia forense..... | 43 |
| Capítulo 6. Biomarcadores..... | 46 |
| 6.1 Biomarcadores usados en genética forense..... | 47 |
| 6.2 Biomarcadores de ADN mitocondrial: ventajas y desventajas..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 6.3 Biomarcadores de cromosoma Y: ventajas y desventajas | 49 |
| 6.4 Biomarcadores STR autosómicos usados en genética forense: ventajas y desventajas..... | 51 |
| 6.4.1 Base de datos CODIS. | 52 |
| 6.5 Biomarcadores de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP's) | 57 |
| 6.5.1 Uso de biomarcadores SNP's para determinación de características físicas..... | 58 |
| 6.5.2 Uso de SNP's para la predicción de color de ojos. | 59 |
| 6.5.3 Uso de SNP's para el análisis de color de cabello | 60 |
| 6.5.4 Uso de SNP's para la predicción de color de piel | 61 |
| 6.5.5 Uso de SNP's para la predicción de edad..... | 61 |
| Capítulo 7. Perfil genómico. | 62 |
| Capítulo 8. Fuentes potenciales de pruebas de ADN para pruebas forenses. | 65 |
| 8.1 Dientes. | 66 |
| 8.2 Huesos..... | 66 |
| 8.3 Saliva. | 67 |
| 8.4 Sangre..... | 67 |
| 8.5 Semen..... | 68 |
| 8.6 Cabello..... | 68 |
| Capítulo 9. Métodos de obtención de ADN para fines forenses..... | 69 |
| 9.1 Extracción de ADN para tejidos en descomposición..... | 70 |
| 9.2 Extracción de ADN de dientes y huesos..... | 71 |
| 9.3 Extracción de restos óseos por métodos no invasivos..... | 71 |
| 9.4 Intercambio aniónico para la extracción de ADN del lisado celular. | 72 |
| 9.5 Tecnología de microfluidos. | 72 |
| Capítulo 10. Micro ARN como biomarcador potencial en genética forense | 73 |
| Conclusiones..... | 74 |
| Bibliografía. | 77 |
| Anexo I. Abreviaturas y Acrónimos. | 85 |
| Anexo II. Glosario..... | 86 |

Índice de ilustraciones y tablas.

| | |
|--|----|
| <i>Ilustración 1. Dogma central de la biología molecular.</i> | 15 |
| <i>Ilustración 2. Ciclo celular.</i> | 16 |
| <i>Ilustración 3. Fases de la mitosis.</i> | 16 |
| <i>Ilustración 4. División celular de una célula somática.</i> | 17 |
| <i>Ilustración 5. Estructura de un nucleótido</i> | 18 |
| <i>Ilustración 6. Estructura del ADN</i> | 19 |
| <i>Ilustración 7. El genoma humano haploide.</i> | 20 |
| <i>Ilustración 8. Cromosoma eucariótico ya duplicado y condensado</i> | 21 |
| <i>Ilustración 9. Cariotipo de un varón</i> | 22 |
| <i>Ilustración 10. Cariotipo humano de varón con la técnica para bandas G</i> | 23 |
| <i>Ilustración 11. Mapa genético del ADN mitocondrial humano</i> | 25 |
| <i>Ilustración 12. Localizaciones cromosómicas para los marcadores Y-STR</i> | 27 |
| <i>Ilustración 13. Microsatélite</i> | 30 |
| <i>Ilustración 14. Clasificación de SNP's de acuerdo a su localización en el genoma</i> | 32 |
| <i>Ilustración 15. Nomenclatura del marcador</i> | 33 |
| <i>Ilustración 16. Enzima de restricción Eco RI</i> | 34 |
| <i>Ilustración 17. Etapas del ciclo de amplificación por PCR.</i> | 38 |
| <i>Ilustración 18. Formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados por PCR</i> | 39 |
| <i>Ilustración 19. Curva melting</i> | 40 |
| <i>Ilustración 20. Curva de amplificación</i> | 42 |
| <i>Ilustración 21. Línea del tiempo de ADN</i> | 45 |
| <i>Ilustración 22. Biomarcadores más usados en genética forense</i> | 47 |
| <i>Ilustración 23. Core Loci del CODIS más AMEL</i> | 53 |
| <i>Ilustración 24. Perfil genético</i> | 62 |
| <i>Ilustración 25. Kit de obtención de perfiles de ADN</i> | 63 |
| <i>Ilustración 26. Electroferograma que muestra los resultados de un análisis de un perfil de ADN</i> | 64 |
| <i>Ilustración 27. Electroferograma que muestra los perfiles STR de cuatro muestras de un caso de violación.</i> | 65 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabla 1. STR del cromosoma Y y características de los biomarcadores Y-STR...</i> | <i>50</i> |
| <i>Tabla 2. Kits más usados en genética forense.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Tabla 3. Características de los nuevos 7 loci del core CODIS 20).....</i> | <i>54</i> |
| <i>Tabla 4. Nuevo Core CODIS.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Tabla 5. Loci usados en los diferentes paneles internacionales.....</i> | <i>57</i> |

Resumen.

La investigación de este trabajo se enfoca en la genética forense, ya que desde el descubrimiento de la huella genética el análisis de ADN ha sido considerado como la “prueba reina” en la ciencia forense.

El objetivo principal del trabajo es evaluar el estado del arte en el campo de los biomarcadores genómicos usados en el ámbito forense.

En genética forense el uso de biomarcadores estandarizados y validados es necesario para obtener resultados confiables. Actualmente se han desarrollado una gran variedad de biomarcadores y técnicas de extracción de ADN que se pueden usar dependiendo de la muestra de la que se parte, la cantidad de la misma y el estado de conservación.

Los biomarcadores más utilizados en genética forense son los STR's (Short Tandem Repeats) autosómicos; la mayor parte de las bases de datos a nivel mundial están basadas en este tipo de marcador, lo que los hace muy importantes para el campo. Otro tipo de biomarcadores STR se encuentran en el ADN mitocondrial y el cromosoma Y, estos biomarcadores por su peculiar heredabilidad son usados principalmente para establecer ancestría y relaciones en línea materna y paterna. Además del uso de STRs se han investigado nuevos biomarcadores, por ejemplo los SNPs que han demostrado tener un mayor grado de exclusión y mayor presencia en el genoma por lo que presentan un gran potencial para el reconocimiento de genes implicados en la determinación de características físicas lo que lo que permitirá predecir el fenotipo de una persona a partir de su genotipo. Estas características podrían favorecer que en un futuro cercano los SNPs desplacen a los STRs en los análisis rutinarios.

Aunque actualmente la determinación del perfil genético de un indicio biológico de interés forense se realiza de manera rutinaria, existen algunos casos donde los resultados obtenidos no son concluyentes. De ahí la importancia de seguir investigando nuevos biomarcadores capaz de usarse en muestras complejas, por ejemplo, actualmente se investigan los micro ARNs que sugieren especificidad en

ciertos fluidos corporales lo que los hace interesantes en el análisis de muestras complejas y muestras mixtas.

Este trabajo tiene como fin demostrar que el análisis de suficientes biomarcadores genéticos puede proporcionar un perfil de ADN que estadísticamente sea único y que se pueda asociar a solo una persona, de ahí la importancia del uso de base de datos nacional que nos permita tener un registro de población mexicana y continuar la investigación y el desarrollo de nuevos biomarcadores de ADN y metodologías que permitan llevar a cabo reformas en los protocolos forenses.

Introducción.

Las ciencias forenses comprenden una amplia y diversa gama de disciplinas científicas que tienen como objetivo asistir a la impartición de justicia mediante el análisis de los indicios y la ponderación de las pruebas. Uno de los mayores avances en las ciencias forenses ha sido el uso de las técnicas de biología molecular, pues es frecuente que en el lugar de los hechos, conocido también como *escena del crimen*, sean encontradas muestras biológicas como sangre, saliva, semen, cabellos, dientes, huesos, uñas y objetos que hayan tenido contacto con la víctima y/o el victimario. Las técnicas de biología molecular se han utilizado para analizar el ADN contenido en estas muestras o indicios biológicos; para posteriormente comparar la muestra dubitada (del lugar de los hechos) con una muestra indubitada (de un sospechoso o de una víctima). Como resultado de esta confronta se podrían correlacionar algunos indicios encontrados en el lugar de los hechos con un sospechoso, es por esto que la prueba genética forense se ha considerado la “prueba reina” desde el surgimiento de la huella genética.

Los biomarcadores son característica que se pueda medir y evaluar objetivamente como un indicador. Para que se pueda usar un biomarcador antes debe de pasar por un proceso de selección y validación donde se evalúan factores como:

- Desarrollo y estandarización de protocolos que tengan en cuenta la adquisición, almacenamiento y tiempo de manejo de la muestra.
- Determinación de la metodología teniendo en cuenta la demografía, estilo de vida, y variables genéticas que influyen las medidas.
- Evaluación de casos control y estudios prospectivos de sensibilidad y especificidad del biomarcador.

A nivel mundial se ha dado un gran impulso a la investigación de la Genética en el ámbito forense, mediante el desarrollo de diferentes procedimientos para maximizar la recuperación del ADN así como la investigación constante de nuevos biomarcadores que puedan integrarse a la lista de biomarcadores validados que hoy en día se utilizan en los diferentes sistemas judiciales además de la constante actualización de bases de datos genéticos. Los biomarcadores son una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador.

En la actualidad el campo de la genética forense en México está enfocado en la realización de pruebas aplicada a problemas jurídicos como:

- asesinatos,
- agresiones y delitos sexuales (violación),
- identificación de restos cadavéricos y personas desaparecidas/no localizadas,
- investigación de la paternidad.

Planteamiento del problema.

A partir del desarrollo de la huella genética (Jeffreys *et al.*, 1985), los biomarcadores genómicos han constituido un campo emergente con posibilidades diversas, ya que sus usos en diferentes áreas han sido de gran utilidad para la resolución de casos.

En México, los esfuerzos del campo forense se han centrado en la mejora de los protocolos para la identificación, así como en realizar todas las pruebas y análisis

genéticos que el sistema de justicia demanda. Es por ello que no se ha puesto el mismo énfasis en el estudio y desarrollo de nuevos biomarcadores así como de bases de datos para realizar comparaciones que permitan descartar de manera confiable a personas inocentes en las investigaciones.

El presente trabajo pretende revisar el estado del arte de biomarcadores genómicos aplicados al área forense, en particular aquellos que brindan información sobre el sexo, el origen biogeográfico, la ancestría, la edad, y el fenotipo.

Objetivo

- Evaluar el estado del arte en el campo de los biomarcadores genómicos usados en el ámbito forense.
- Realizar una revisión sobre los nuevos biomarcadores que se han validado y que hoy en día se utilizan en los diferentes sistemas judiciales.
- Investigar sobre los biomarcadores que potencialmente puedan aportar información nueva que pueda ser usada en la resolución de casos forense
- Plantear la base que permita desarrollar una nueva línea de investigación en el Laboratorio de Genética Forense de la Licenciatura en Ciencia Forense de la UNAM.

Metodología.

El presente trabajo consiste en una investigación de tipo documental sobre biomarcadores en genética forense. La revisión se realizó en:

- 1) Revistas especializadas en Ciencias forenses
 - i) Forensic Science International
 - ii) Forensic Science, Medicine ADN Pathology
 - iii) American Journal of Human Genetics
 - iv) Legal Medicine
- 2) Páginas de internet
 - i) National Center for Biotechnology Information
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 - ii) US National Library of Medicine National Institutes of Health
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
 - iii) FBI <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>
- 3) Libros de genética con enfoque forense.
 - i) Introducción a la Genética forense
 - ii) Handbook of Forensic Genetics: biodiversity ADN Heredity in Civil ADN criminal Investigation
 - iii) Basic Genetics ADN Human Genetic Variation
 - iv) Introducción a la genética humana
- 4) Bases de datos
 - i) SNPs <http://strbase.nist.gov/>

Los criterios y palabras claves para la búsqueda fueron:

- Genética forense
- Biomarcadores forenses
- CODIS
- SNP's
- STRs

La revisión abarca los últimos 7 años en la consulta de los artículos publicados las diferentes fuentes.

Capítulo 1. Conceptos generales de biología molecular.

La genética involucra el estudio de genes y sus efectos; los genes constituyen las unidades de la herencia, en ellos se encuentran las instrucciones que las células requieren para sintetizar proteínas, que a su vez dirigen las actividades de la célula y finalmente, las funciones del organismo.

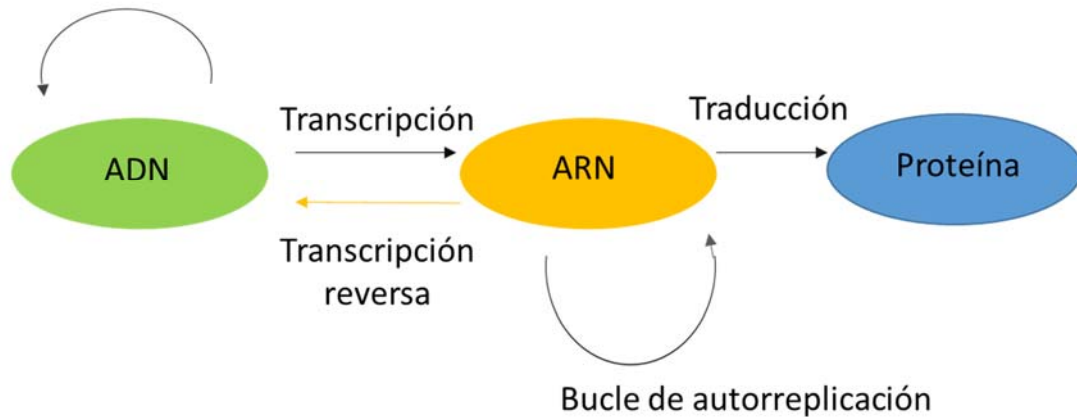
La biología molecular es el estudio de las reacciones e interacciones moleculares que sustentan la función biológica (Bates, *et al.*, 2014). La biología molecular ha evolucionado a través de la historia, gracias a diversas ciencias, técnicas, descubrimientos y desarrollos tecnológicos que se encuentran entrelazados. Por ello, se describen a continuación algunos acontecimientos relevantes para el campo.

1.1 El ADN como material genético y hereditario.

En la (Ilustración 1) se esquematiza el flujo de información genética en un nivel celular. El primer paso del flujo de información es cuando el ADN se duplica por medio del proceso de autorreplicación antes de la división celular mediante el proceso de replicación semiconservativa, se dice que es semiconservativo ya que la doble hélice de ADN cuando se duplica, conserva una de sus hebras (cadena templado), y sintetiza la otra *de novo*, por complementariedad de bases, añadiendo nucleótidos y utilizando la cadena madre como patrón (templado). Las instrucciones codificadas en los genes se expresan mediante dos procesos; el primero es la transcripción (copia) de información genética a otro tipo de ácido nucleico: el ARN (ácido ribonucleico). Tanto los exones como los intrones se transcriben a una molécula de ARN mensajero inmaduro (ARN_m). Posteriormente, dicha molécula es modificada, en un proceso conocido como *splicing* o proceso de corte y empalme en el que se eliminan los intrones, se unen los exones, y se añaden características únicas a cada extremo del ARN_m . Se crea así una molécula de ARN madura, que se transporta hacia los ribosomas, localizados en el citoplasma celular. Los ribosomas están formados por ARN ribosomal (ARN_r) y proteínas, y constituyen el

sitio donde ocurre la segunda parte del proceso, la traducción del ARN_m en proteína a todo este proceso se le conoce como el dogma central de la biología molecular. Este dogma se ha complementado con dos nuevos procesos como son la transcripción reversa y la autorreplicación del ARN, ambos encontrados en ciertos grupos de virus cuyo material genético está compuesto de ARN. (Lisker, *et al.*, 2013)

Bucle de autorreplicación



*Ilustración 1. Dogma central de la biología molecular. ADN ácido desoxirribonucleico; ARN ácido ribonucleico imagen modificada de (Lisker, *et al.*, 2013)*

1.2 Ciclo celular.

La proliferación celular se da mediante una serie de etapas denominadas 'ciclo celular'. (Ilustración 2). Después de la mitosis, la célula puede entrar a un periodo donde no se divide a este periodo se le conoce como G0 o continuar el ciclo y entrar a la interfase. La interfase se considera el estado inicial del ciclo pues es el intervalo entre dos divisiones. Durante la interfase la célula duplica su contenido genético a este periodo se le conoce como fase S además de este periodo existen otros antes y después de la fase S que se denominan G1 y G2. En ambas fases hay actividad metabólica y crecimiento y al final de la G2 la célula inicia el proceso de mitosis y citocinesis (fase M) donde se producirán dos células hijas y el ciclo celular empezara de nuevo. (Klung *et al.*, 2013).

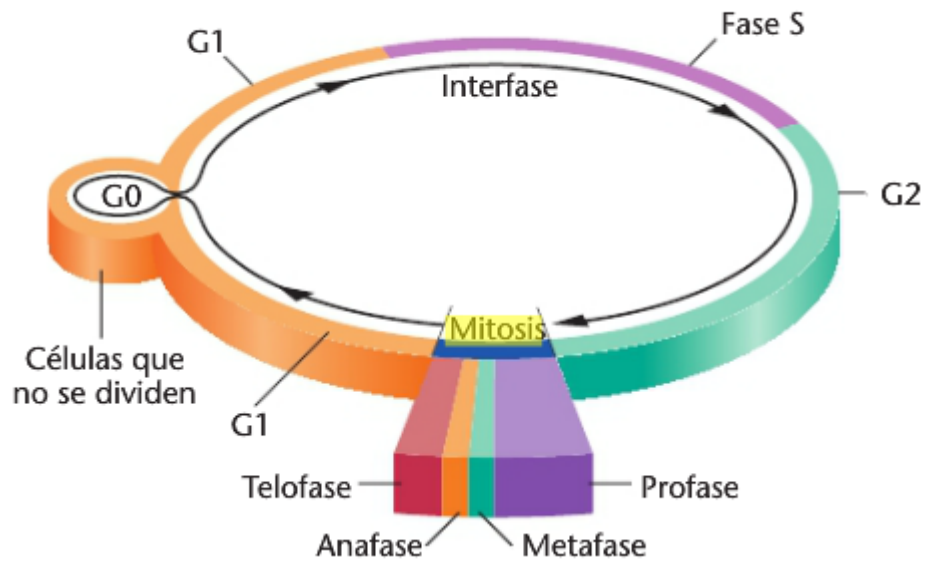


Ilustración 2. Ciclo celular imagen tomada de (Klung et al, 2013)

En la fase M se incluye a la mitosis/meiosis y la citocinesis. La mitosis para células somáticas y meiosis para células sexuales en esta etapa los componentes se separan a polos opuestos de la célula (Ilustración 3) y citocinesis se da una separación física de las células hijas. (Lisker, et al., 2013)

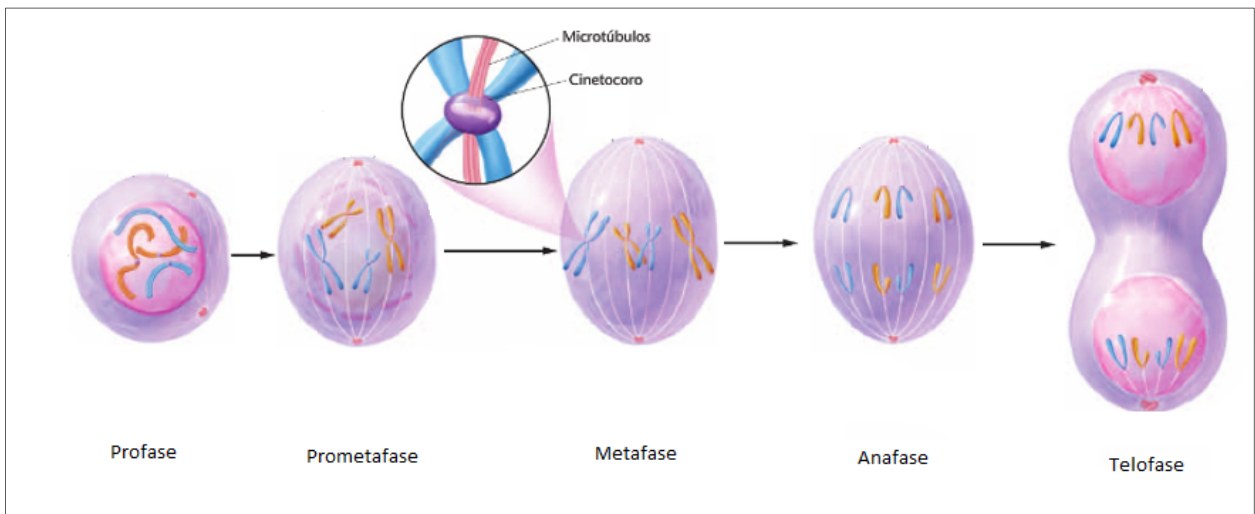


Ilustración 3. Fases de la mitosis de una célula somática. Profase: Los cromosomas se enrollan y se acortan; los centriolos se dividen y se separa. Prometafase: Los cromosomas forman claramente estructuras dobles; los centriolos alcanzan los polos opuestos; se forma las fibras del huso. Metafase: Los centrómeros se alinean en la placa metafásica. Anafase: Los centrómeros se dividen y los cromosomas migran a polos opuestos. Telofase: Los cromosomas hijos llegan a los polos; comienza la citocinesis. Imagen modificada de (Klung et al, 2013)

El número haploide de cromosomas, es decir el número de cromosomas distintos, que es característico de cada especie se representa por la letra n ; una célula somática tiene un número diploide ($2n$) de cromosomas, ya que tiene 2 copias de cada cromosoma (n pareja de cromosomas homólogos). Antes de entrar en la fase S, una célula somática tiene un número $2n$ de cromosomas y un contenido total de ADN correspondiente a una cromátide por cromosoma: esto se representa por la cantidad de ADN $2C$. Al final de la replicación del ADN, esa célula sigue teniendo $2n$ cromosomas (todavía indivisibles) pero ahora tiene un contenido de ADN igual a $4C$, ya que hay dos cromátides por cromosoma. Tras la mitosis, la segregación de las cromátides hermanas tiene como resultado que cada una de las células hijas lleva otra vez $2n$ cromosomas y un contenido de ADN igual a $2C$. De este modo, se mantiene el número de cromosomas y la cantidad total de ADN tras las sucesivas divisiones celulares. (Lisker, *et al.*, 2013)(Ilustración 4)

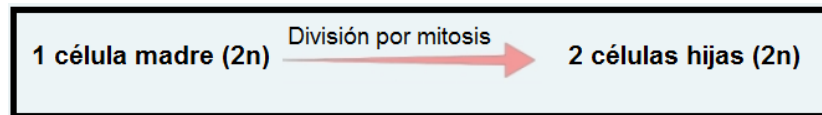


Ilustración 4. División celular de una célula somática. Imagen tomada de (Klung *et al.*, 2013)

1.3 El ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es una macromolécula, cuya unidad básica es un nucleótido formado por un azúcar de cinco carbonos denominado desoxirribosa, al cual se esterifica un fosfato en la posición 5' y una base nitrogenada en el carbono 1'.(Ilustración 5)

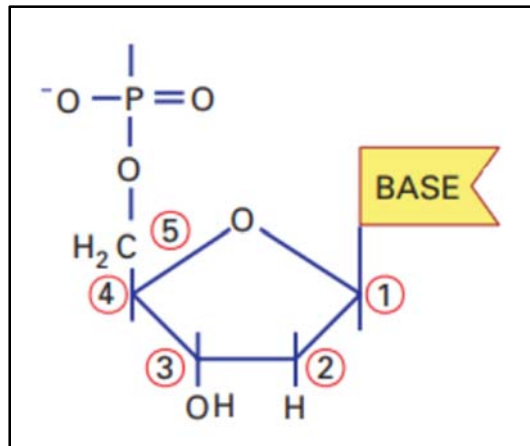


Ilustración 5. Estructura de un nucleótido Imagen modificada de (Lisker, et al., 2013)

Existen dos tipos de bases nitrogenadas presentes en un ácido nucleico: las pirimidinas; timina (T) y citosina (C), que contienen un solo anillo; y las purinas; guanina (G) y adenina (A) las cuales poseen dos anillos (Ilustración 6 a) (Lisker, *et al.*, 2013). El ADN está formado por dos cadenas de nucleótidos, ambas cadenas se disponen en sentido contrario lo que quiere decir que son antiparalelas y se enrollan en espiral formando una doble hélice (Watson & Crick, 1953). Las bases nitrogenadas se unen de manera apareada y específica, de forma tal que la Adenina y la Timina son complementarias y su unión se da mediante dos puentes de hidrógeno. A su vez, la Citosina se une con la Guanina, mediante tres puentes de hidrógeno, lo que confiere al ADN diferentes propiedades citogenéticas. (Ilustración 6 b) (Lisker, *et al.*, 2013).

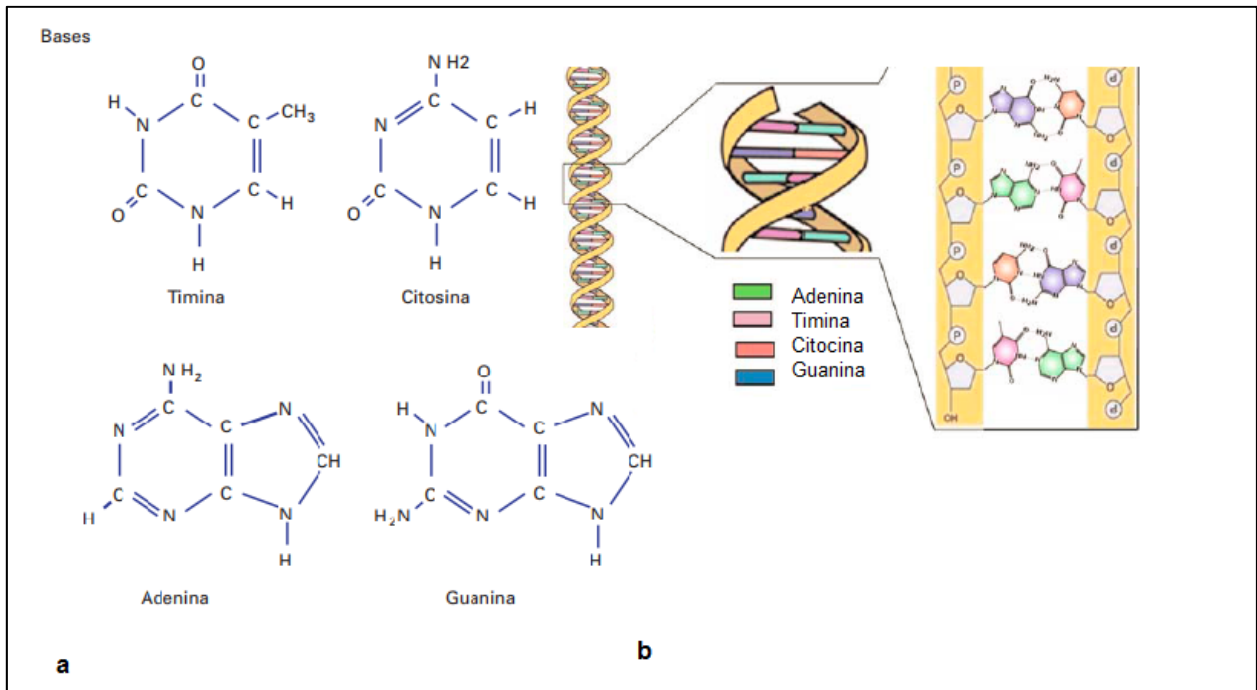


Ilustración 6. Estructura del ADN. a: Estructura de las bases nitrogenadas Arriba las pirimidinas y abajo las purinas y b: Representación de cadena de ADN y a interacción de las bases nitrogenadas Adenina con Timina y Citosina con Guanina Imagen tomada de (Lisker, et al., 2013)

Capítulo 2. El Genoma

El descubrimiento de que en el ácido desoxirribonucleico (ADN) está codificada la información genética (Hershey & Chase, 1952), la resolución de su estructura (Watson & Crick, 1953) y la determinación del mecanismo de la expresión genética han permitido establecer las bases de la herencia de todo organismo viviente así como el concepto del genoma (Klug, et al., 2013). El genoma humano está compuesto por ADN nuclear, también llamado genoma nuclear y ADN organelar que se encuentra en mitocondrias denominado genoma mitocondrial y el cloroplástico en organismos que lo contienen. El genoma humano tiene 3.2×10^9 pares de bases, de los cuales solo una pequeña porción, aproximadamente el 2%, corresponde a la información que codifica para proteínas, un 23% del genoma

corresponde a diferentes tipos de secuencias no codificantes que están implicadas en el proceso de regulación de genes y un 70% del genoma se llama extragenómico y son secuencias que no tienen función conocida (Alessandrini, *et al.* 2012) (Ilustración 7). Se usa el término de información porque el genoma por sí solo no tiene un papel activo en el desarrollo del organismo; es la secuencia bases del ADN y su expresión las que determinan el desarrollo de un organismo, ya que la producción de las proteínas necesarias para el organismo en el tiempo y lugar apropiado es el resultado de una compleja serie de interacciones de las genes codificados en la secuencia del ADN mediante el dogma de la biología molecular. (Klug, *et al.*,2013).

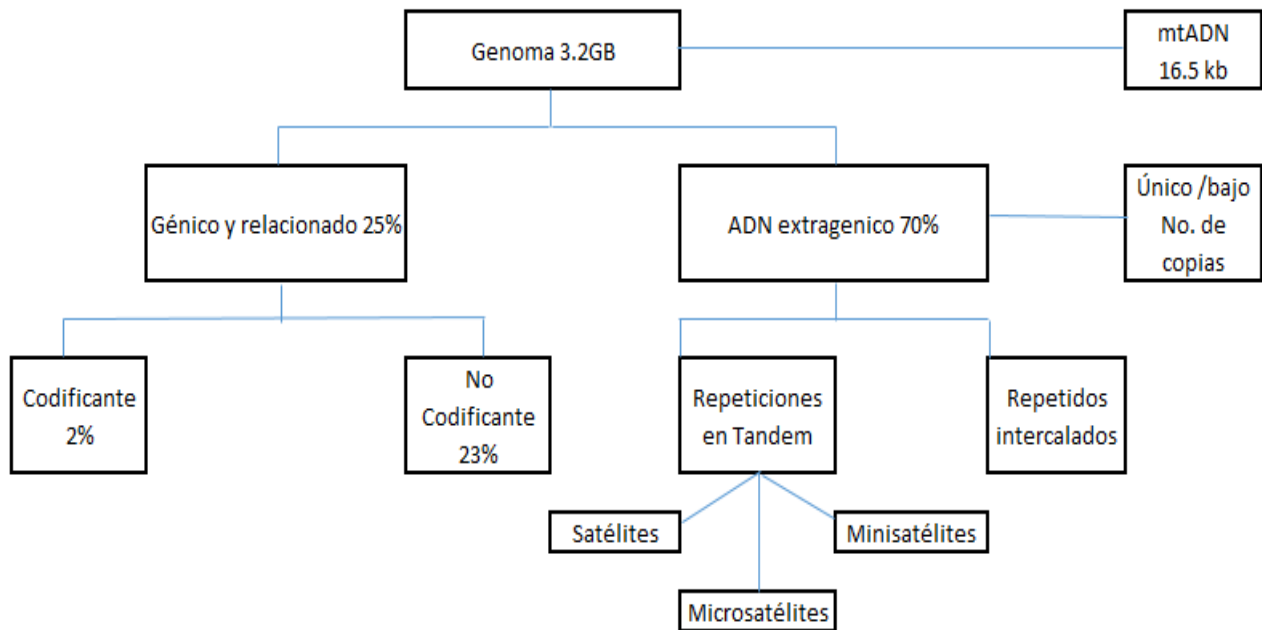


Ilustración 7. El genoma humano haploide.

*El genoma humano contiene aproximadamente 3×10^9 pares de bases, aunque no todas son expresivas en términos de producción de proteínas. El genoma de los eucariotas superiores, contiene secuencias de ADN con una función determinada (genes que codifican la secuencia de aminoácidos de una proteína) denominadas ADN codificante y secuencias de ADN que no son transcritas a proteínas y que se conoce como ADN no codificante. Existen numerosos ejemplos de polimorfismos en el genoma humano. A nivel del ADN, los polimorfismos pueden ser de diversos tipos, desde la mutación de una sola base hasta el cambio en el número de unidades repetidas en tándem en ciertas regiones del ADN. El ADN repetitivo en tándem está formado por bloques de ADN que se repiten consecutivamente y se suele dividir en ADN satélite, ADN mini satélite y ADN micro satélite. Imagen modificada de (Klug, *et al.*, 2013).*

2.1 Organización del ADN dentro de la célula: Cromosomas y cariotipo

La mayoría del ADN celular se localiza en el núcleo, esto implica que el ADN debe de adoptar un alto grado de empaquetamiento que se lleva a cabo mediante la unión a la doble hélice de varios tipos de proteínas, denominadas histonas, para dar lugar a una forma peculiar de empaquetamiento conocida como cromatina. En cada ciclo celular la cromatina adopta una estructura única, esta estructura súper enrollada se denomina cromosoma (Ilustración 8). (Lisker, *et al.*, 2013). El cromosoma es la estructura responsable del almacenamiento de la información genética. En el caso de la especie humana se determinó que el ADN está empaquetado en 46 unidades de cromosomas: 22 pares de cromosomas somáticos más 2 cromosomas sexuales (X, Y) (Tijo & Levan, 1956)

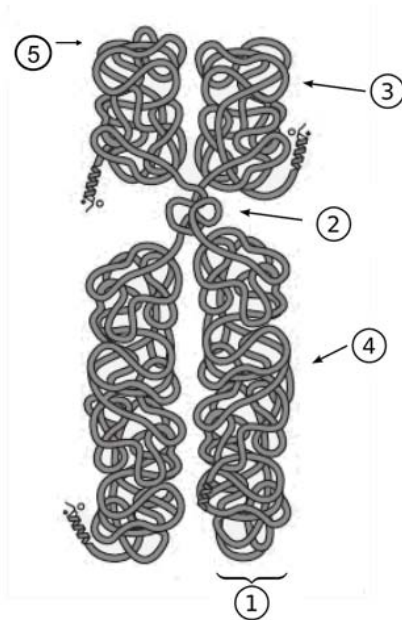


Ilustración 8. Cromosoma eucariótico ya duplicado y condensado (en metafase mitótica). (1) Las cromátidas: Son estructuras idénticas en morfología ya que contienen una molécula de ADN. (2) El centrómero: Se encuentra en un estrechamiento llamada constricción primaria, que divide a cada cromátida del cromosoma en dos brazos. En este punto ambas cromátidas se tocan (3) Brazo corto (p) (4) Brazo largo. (q) (5) Los telómeros: Al extremo de cada brazo del cromosoma se le denomina telómeros. El ADN de los telómeros no se transcribe y en cada proceso de división celular se acorta. Imagen modificada de (Klung et al, 2013)

Los cromosomas se han estudiado mediante la citogenética, que se enfoca en el estudio de los cromosomas humanos; la citogenética clásica se basa en la generación y análisis del cariotipo, que es la presentación ordenada de los cromosomas cuando se pueden observar en metafase (Lisker, *et al.*, 2013) (Ilustración 9).

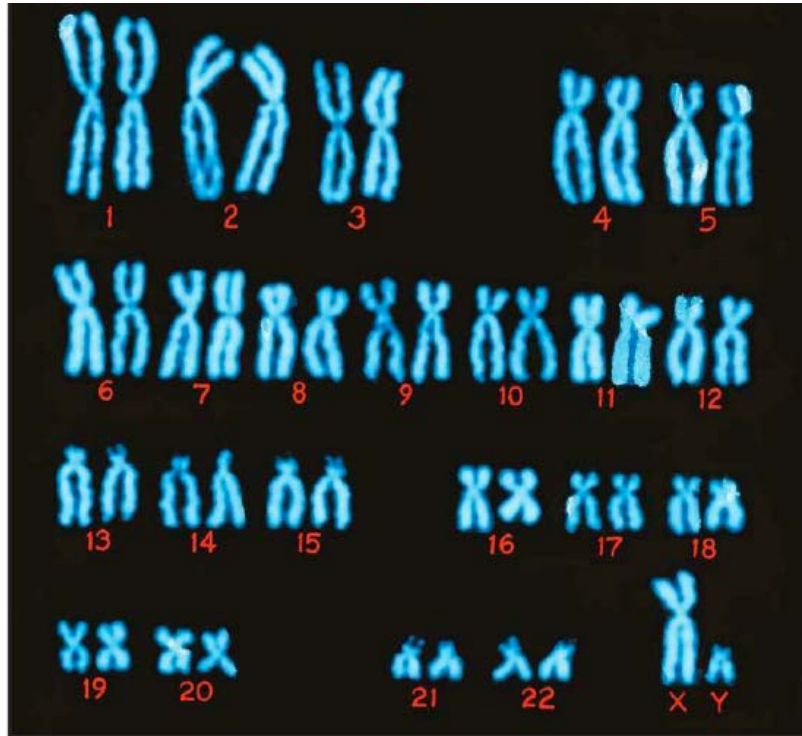


Ilustración 9. Cariotipo de un varón. Se muestran los 22 cromosomas autosómicos así como los cromosomas sexuales (XY y XX). Imagen tomada de (Klung et al, 2013)

Existen dos tipos de cromatina, la eucromatina que se sabe que es funcional y rica en C-G, y debido a sus triples enlaces dificultan la entrada de colorantes, por lo que no se tiñe; y la heterocromatina que es no funcional, rica en A-T y se puede teñir con mayor facilidad. Esta generalización es aplicable a los cromosomas metafásicos bandeados, en los cuales las bandas claras o reversas (R) representan eucromatina rica en genes activos y las bandas oscuras (G o Q) heterocromatina rica en genes inactivos (Lisker, *et al.*, 2013)

El primer método para visualizar los cromosomas fue el método de banas Q, consiste en teñir los cromosomas con un colorante fluorescente con afinidad por regiones ricas en adenina y timinas, lo cual produce unas bandas características en los cromosomas cuando se observan con luz ultravioleta. El método de bandas G consiste en someter la preparación a una digestión suave con tripsina antes de teñirlas con Giemsa, un colorante con afinidad por el ADN; cuando se analizan las preparaciones al microscopio de luz, se observan unas bandas oscuras (bandas

G) separadas por unas bandas claras (Ilustración 10). Para teñir los cromosomas según el método de bandas R se someten las preparaciones a un tratamiento de calor en solución salina antes de la tinción de Giemsa, lo cual produce un patrón de bandas claras y oscuras que es el inverso al que se obtiene en el método de bandas G. Esto se debe a que el tratamiento por calor ocasiona la desnaturalización de las regiones ricas en adeninas y timinas, por lo que las bandas R oscuras corresponden a las bandas G claras. El método de bandas C, se utiliza para teñir la heterocromatina constitutiva (centrómeros) y consiste en la tinción con Giemsa tras la desnaturalización en una solución saturada de hidróxido de bario. (Taylor *et al.*, 2016)

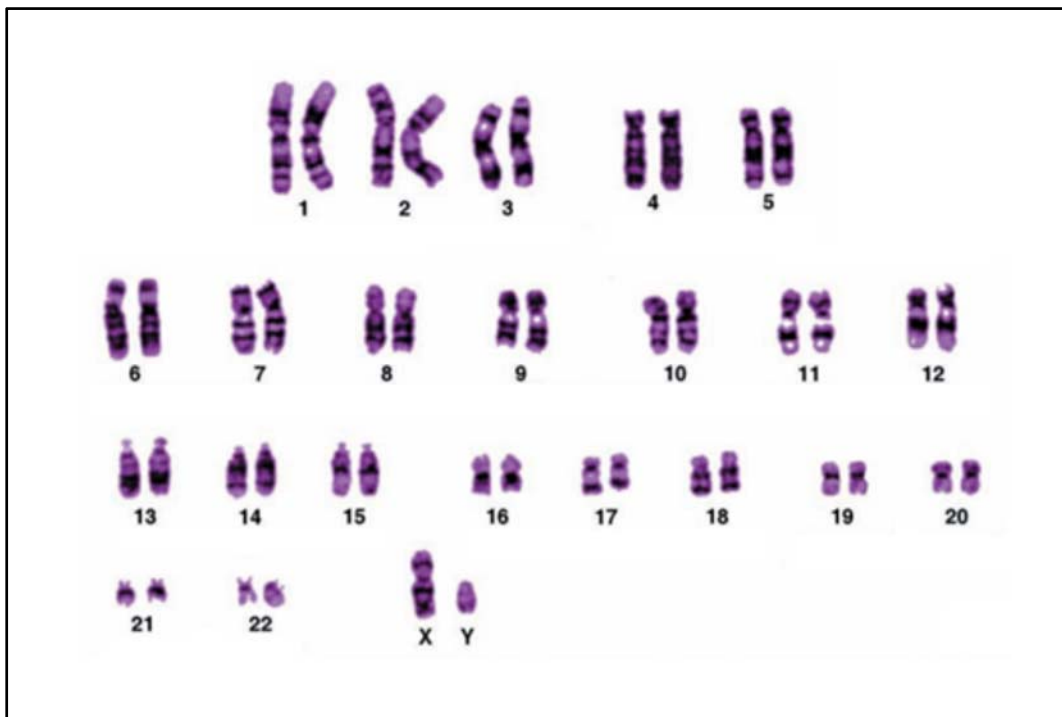


Ilustración 10. Cariotipo humano de varón. Los cromosomas se han teñido utilizando la técnica de listado cromosómico para bandas G. Imagen modificada de (Klung *et al.*, 2013)

Los métodos anteriormente descritos, permitieron establecer que existía una diferente constitución en los cromosomas y de manera general señalaron diferentes porciones en cada cromosoma. Se sabe que algunas de estas bandas corresponden a diferentes genes cuya localización particular en un cromosoma es llamada *locus*. Los genes nucleares que se encuentran en sitios específicos (*loci*) a

lo largo de estos cromosomas son heredados uno de la madre y uno del padre y estos no siempre son iguales (heterocigotos). Los dos pares de cromosomas pueden contener genes en *locus* que sean diferentes y esas variantes de un gen se llaman alelos. Cada cromosoma contiene cientos o miles de *loci* y cada *locus*, a su vez consta de 2 alelos, por lo que si comparáramos el mismo *locus* en un par de cromosomas, podríamos determinar si los pares son formas diferentes del mismo gen o si son idénticos. Si los genes en el par son estructural o funcionalmente diferentes, entonces se dice que el individuo es heterocigótico y si son idénticos, entonces se dice que el individuo es homocigótico en este *locus*. Un individuo puede ser homocigótico en un *locus* y heterocigótico en otro. (Buckleton *et al.*, 2016)

2.2 ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADN_{mt}), como su nombre lo indica, se encuentra dentro de la mitocondria, que es el organelo encargado de la respiración celular, la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP y la beta-oxidación de ácidos grasos, entre otros procesos. Fue secuenciado por primera vez en 1981 (Anderson, *et al.*, 1981) y se sabe que posee una estructura circular y cerrada de 16, 569 pb; las dos cadenas del ADN_{mt} reciben el nombre de cadena L (ligera o *light*) y cadena H (pesada o *heavy*) (Ilustración 11). La mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes) se encuentran en la cadena H la mayoría se distribuyen en la cadena H de forma muy compactada, llegando incluso a solaparse. El ADN_{mt} codifica para 38 genes: 2rARN (12S y 16S), 22tARN y 13 genes estructurales La mayor región no codificante es conocida como región control o *D-Loop*, ocupa 1122 pares de bases y se sitúa entre el gen que codifica para el ARN de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina. (Lisker, *et al.*, 2013).

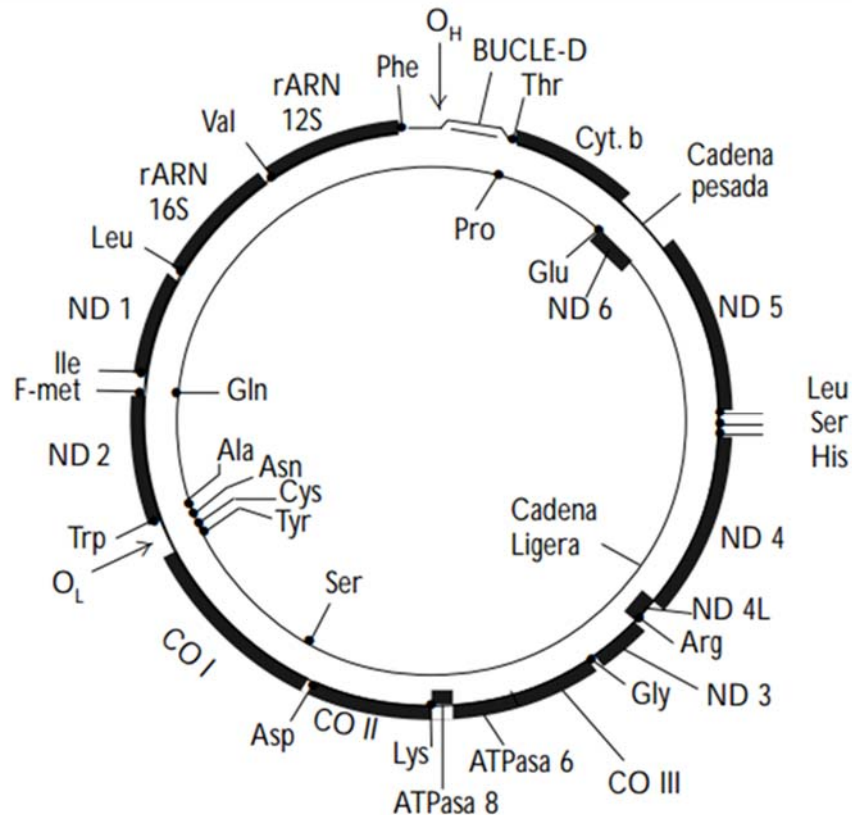


Ilustración 11. Mapa genético del ADN mitocondrial humano. Se representa las dos hebras del ADN con los genes que codifican: dos ARNs ribosomales (ARNr) ,12S y 16 S, los 22 ARNs de transferencia señalados con la abreviatura del aminoácido que transportan y secuencias que codifican para proteínas (CO: subunidades de citocromo C oxidasa; CYT B: Citocromo B y ND: subunidades de NADH deshidrogenasa) ATPasa; Complejo V o ATP sintetasa H₁, H₂ y L indican los lugares de iniciación de la transcripción de las hebras pesada y ligera, respectivamente. O_H, O_L simbolizan los orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera. Tomada de (Solano, Playán, López-Pérez, & Montoya, 2001)

Las principales características que hacen atractivo al ADN_{mt} para análisis forenses son que ADN_{mt} se transmite por vía materna, que es ADN citoplasmático o extracromosómico, es decir, no está en los cromosomas del núcleo, y que debido a su tamaño, estabilidad y forma tiene un alto grado de conservación comparado con el ADN nuclear además, el ADN mitocondrial es más abundante. (Alessandrini, *et al.* 2012).

2.2.1 Homo- y Heteroplasmía

Un punto importante es que mientras que la mitosis asegura la segregación balanceada de las copias del material genético del núcleo, no hay ningún mecanismo que haga lo mismo para las mitocondrias. Su material genético, al igual que el ADN nuclear, puede sufrir mutaciones en algunas mitocondrias y no en otras lo que puede ocasionar que haya dos tipos de ADN en una misma célula. (Lisker, *et al.*, 2013).

Se habla de homoplasmia cuando el ADN de todas las mitocondrias es igual entre sí, y de heteroplasmía cuando una porción de ellas es distinta y por tanto las mitocondrias con genomas que portan mutaciones se heredan de forma azarosa. (Lisker, *et al.*, 2013).

2.3 Cromosoma Y

El cromosoma Y contiene alrededor de 60 Mega pares de bases (Mpb) y el 60% de este ADN está constituido por secuencias polimórficas, altamente repetidas confinados principalmente a la porción heterocromática del brazo largo (q) (Roewer, *et al.*, 1996). En estas regiones polimórficas se localiza el haplotipo de cromosoma Y que son transmitidas intactas de generación en generación por línea paterna y en forma obligada, los cambios que podrían presentarse son el resultado de mutaciones, expresando así un registro informativo de su historia. Se puede afirmar que el cromosoma Y es un componente importante del genoma humano debido a que lleva a cabo funciones biológicas esenciales como lo son la determinación del sexo y su intervención en la fertilidad masculina, además, debido a la falta de un componente homólogo (que determina una haploidia parcial), la mayor parte del cromosoma Y no se recombina durante la meiosis. Solo se produce recombinación con el cromosoma X en dos pequeñas regiones pseudoautosómicas denominadas PAR1 y PAR2. Aunque la mayor parte del cromosoma Y se considera genéticamente inerte, en éste se pueden diferenciar tres regiones, dos

pseudoautosómicas (PAR1 y PAR2) y una específica del cromosoma Y, interesantes desde el punto de vista genético forense pues se encuentran algunos genes que determinan el sexo, así como secuencias repetitivas específicas del cromosoma. (Coble, *et al.*, 2016) (Ilustración 12)

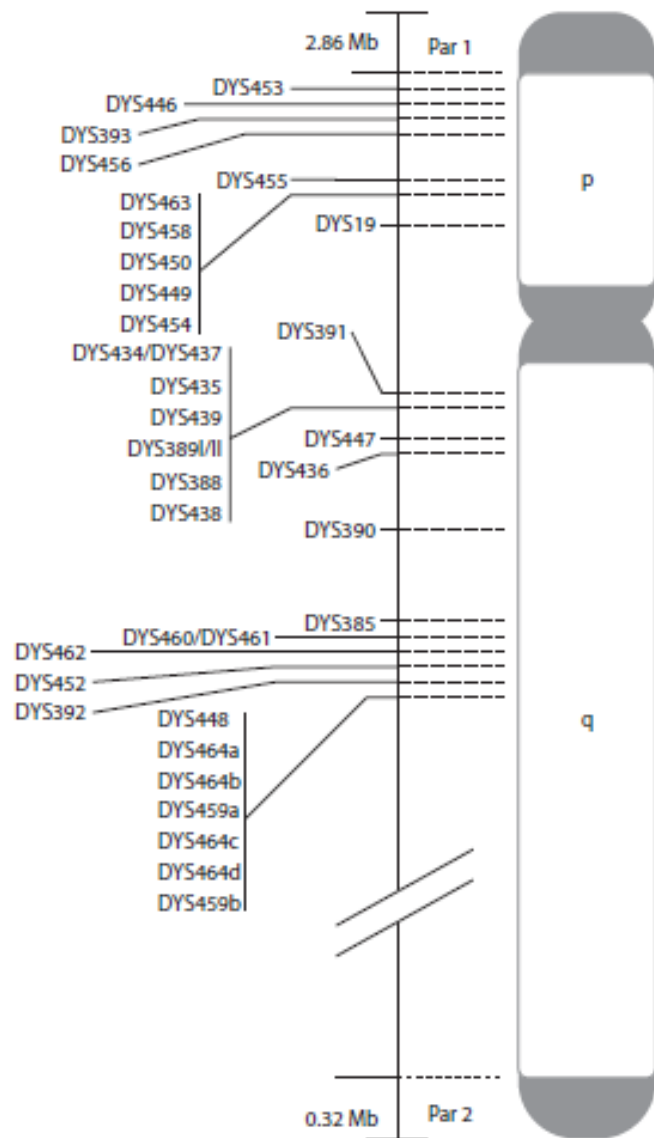


Ilustración 12. Cromosoma Y. Localizaciones cromosómicas para los marcadores Y-STR más comunes. Imagen tomada de (Coble, *et al.*, 2016)

Capítulo 3. Variabilidad genética: mutaciones y polimorfismos.

A pesar de que el ADN es el reservorio de la información que la célula necesita para vivir, se sabe que presenta una variabilidad, es decir, difiere entre los seres vivos incluidos los de la misma especie y esta variabilidad puede ser heredada. Aunque se ha estimado que los organismos de una misma especie presentan una similitud en la secuencia de su genoma superior al 99%, el porcentaje restante define la variabilidad genética. Estos cambios son mutaciones que pueden ser originadas por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN o por factores ambientales, estas mutaciones pueden a su vez, tener efectos deletéreos y causar enfermedades, ya que estas alteraciones genéticas pueden ser grandes reorganizaciones cromosómicas, así como las modificaciones llevadas a cabo en uno o en pocos nucleótidos, duplicaciones o deleciones de fragmentos y hasta de cromosomas enteros y/o las modificaciones más frecuentes son llevadas a cabo en uno o en pocos nucleótidos. Por tanto un polimorfismo es las variaciones del genotipo en ciertos segmentos de ADN solo si la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. (Paz *et al.*, 2014).

Tipos de polimorfismos

Existen dos tipos de polimorfismos genéticos:

- a) Polimorfismo de longitud. Los que implican cambios en el tamaño de la secuencia, esto puede deberse a inserciones o deleciones de la secuencia de ADN, o bien a repeticiones de bases (o combinación de bases) de manera continua en un segmento del ADN como los polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (STR) y Numero Variable de Repeticiones en Tandem (VNTR) (Salazar Montes, Sandoval Rodríguez, & Armendáriz Borunda , 2013)
- b) Polimorfismos de secuencia. Los que muestran cambio de un solo nucleótido por sustitución de bases un ejemplo son los polimorfismos de nucleótido único (SNP's). (Salazar Montes, Sandoval Rodríguez, & Armendáriz Borunda , 2013)

3.1 Polimorfismo de Repeticiones Cortas en Tándem (STR)

El ADN repetitivo en tándem está formado por bloques de ADN que se repiten consecutivamente y se suele dividir en ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite. El ADN minisatélite y microsatélite, consisten en pequeñas repeticiones de fragmentos de ADN de número variable, por lo que genéricamente se denominan VNTR (*variable number of tandem repeats*). Estos polimorfismos se clasificaron, según el tamaño de sus unidades repetitivas. (Lisker, *et al.*, 2013).

Los minisatélites son *loci* que corresponden a secuencias de ADN de unas 8 a 100 pares de bases repetidas en tándem de 5 a 1000 veces. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, de forma que en un cromosoma el número de repeticiones en tándem puede ser de 10, en otro de 15, en otro de 22, etc. La singularidad más especial de este tipo de polimorfismos está en que cada *loci* puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones), sin embargo, presentan el inconveniente de que no están distribuidos por todo el genoma y eso limita su uso. Los VNTR-minisatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial. Anteriormente, cuando se habla de huellas dactilares del ADN se hacía referencia a este tipo de polimorfismo. Los VNTR-microsatélites son por excelencia los polimorfismos anónimos utilizados en el diagnóstico genético. Corresponden a la repetición en tándem de secuencias de entre 2 y 6 nucleótidos (Ilustración 13).

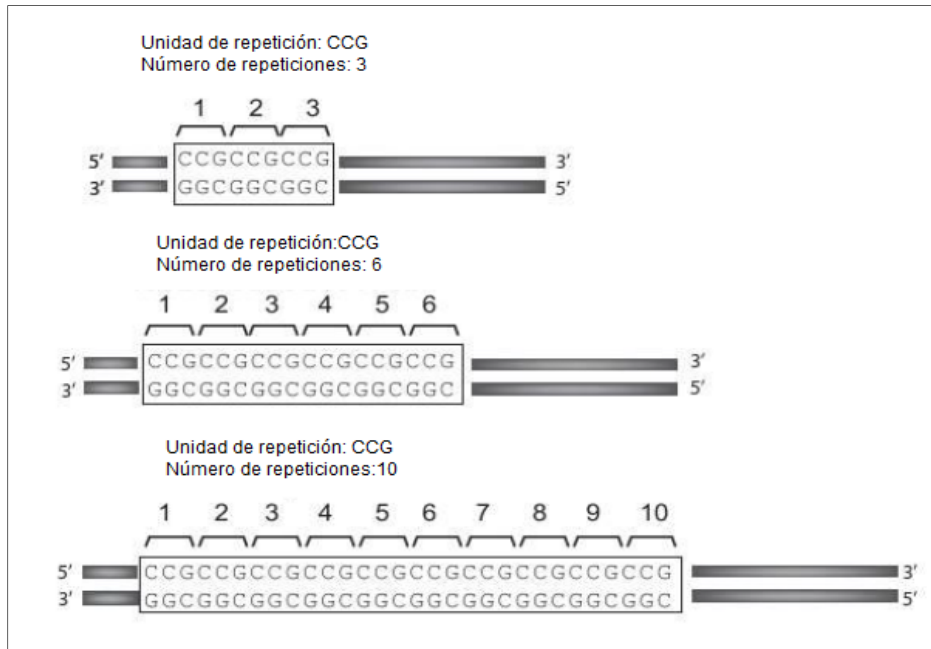


Ilustración 13. Microsatélite; secuencia de 3 nucleótidos que se repiten hasta 10 veces en el genoma Imagen tomada de (Lisker, González, & Zentella Dehesa, 2013)

3.2 Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)

El polimorfismo más frecuente y de menor tamaño que encontramos en el genoma humano es el SNP, cada SNP se considera como un polimorfismo bialélico es decir, con 2 alelos posibles (Alessandrini, *et al.* 2012). Como se mencionó, los polimorfismos se distinguen de las mutaciones por su frecuencia, ya que las diferentes formas de los polimorfismos (llamados “alelos”) son más frecuentes que las mutaciones, esto es, en una frecuencia mayor al 1%. La gran mayoría de los SNP’s tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o mutante, esta clasificación está basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente. Actualmente, en el “dbSNP” que es una base pública de datos de Polimorfismos de Nucleótido

Sencillo, por sus siglas en inglés) (Database of single nucleotide polymorphisms, 2017), Se catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN. Se ha descrito que la frecuencia de SNP's es de uno cada 200 pares de bases en el genoma humano, por lo que se han calculado que podrían existir aproximadamente 6 millones de SNP's en el genoma humano, muchos de estos ya han sido descritos en el dbSNP. Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNP's les conoce como "no sinónimos", ya que este tipo de cambio afectarían directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones, Así mismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a desarrollarla; algunos de los cambios pueden estar en la región promotora del gen, afecto ADN su transcripción al modular la unión de factores de transcripción. Pueden estar también en intrones, módulo ADN la estabilidad de la proteína o en sitios de corte y empalme en los que ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) y finalmente las variaciones pueden presentarse en regiones intragénicas. (Betticher *et al.*, 1995)

Otro tipo de SNP's son los llamados "sinónimos" (o silenciosos) los cuales no alteran la función del gen a proteína codificada en el gen; sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido.

Según su localización en el genoma, los SNP's (Polimorfismos de nucleótido simple), se clasifican en: SNPi, si están localizados en regiones intrónicas; SNPc, en regiones codificantes (exones); SNPr, en regiones reguladoras, y SNPg, localizados en regiones intergenómicas. Los SNPc pueden estar representados por SNP's sinónimos (SNP's) o no sinónimos (SNPns). (Ilustración 14). Un dato interesante de los SNP's es que, a diferencia de otro tipo de marcadores como los microsatélites cuya tasa de mutación es de una magnitud aproximada de 10^{-8} éstos presentan una tasa menor de mutación por lo que son de gran ayuda en estudios de genética de poblaciones para tratar de explicar fenómenos biológicos como la evolución de la especie humana. (Amorim & Budowle, 2017).Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos por

un conjunto de SNP's a lo largo de un mismo cromosoma que son heredados como una unidad. La diferencia fundamental entre un haplotipo y los SNP's individuales, es que los alelos en los haplotipos son asignados a un cromosoma. Prácticamente cada individuo tendrá dos haplotipos para un fragmento del genoma, representados por los cromosomas paterno y materno. Estos haplotipos son de gran utilidad, ya que proporcionan información acerca de la recombinación, la cual es el intercambio físico del ADN durante la meiosis. La información obtenida de este tipo de datos es importante, ya que permite localizar mutaciones que pueden ser causantes de alguna enfermedad mediante métodos de análisis de ligamiento. Se puede evaluar su efecto mediante estudios de asociación del genoma humano, en los que se analiza el desequilibrio de ligamiento. Este desequilibrio de ligamiento puede ser entendido como una asociación entre los SNP's; es decir, al conocer el genotipo en un SNP se puede predecir el genotipo de otro SNP si la asociación (desequilibrio de ligamiento) es alta entre estos dos SNP's (Caratachea, 2007)

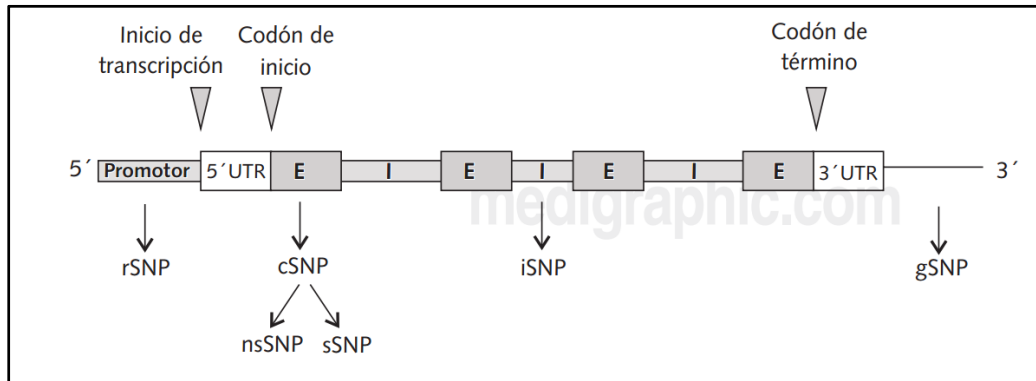


Ilustración 14. Clasificación de SNP's de acuerdo a su localización en el genoma (E: Exones; I: Intrones; UTR: Regiones no codificantes) iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras, y gSNP, localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP). Imagen tomada de (Caratachea, 2007)

3.2.1 Nomenclatura de SNP's

Usualmente, la nomenclatura utilizada para designar un marcador genético se basa en su ubicación cromosómica; si este marcador está dentro de un gen específico o muy cercano a él y si dicho gen tiene una función conocida y se le ha asignado un nombre, el marcador genético utilizado tendrá un nombre derivado con relación a dicho gen. Por ejemplo: el marcador FGA deriva su nombre por estar en el gen que codifica la cadena α del fibrinógeno (*Human Fibrinogen alpha chain*). Sin embargo, aún no conocemos la totalidad de los genes a pesar de haberse obtenido la secuencia del genoma humano, por lo que para los fragmentos de ADN en los cuales no se conoce su función, se sigue la siguiente nomenclatura: la primera letra del nombre del marcador es una “D” y significa ADN. Luego, tenemos un número que representa en que cromosoma el marcador está localizado. El tercer elemento del nombre es la letra “S”, secuencia de copia única “Z” Segmento repetitivo en sitio específico “F” Secuencia Homóloga en múltiples cromosomas. Por último, tenemos el número del *locus* en que el marcador fue descrito (Butler & Hill, 2012) (Ilustración 15)

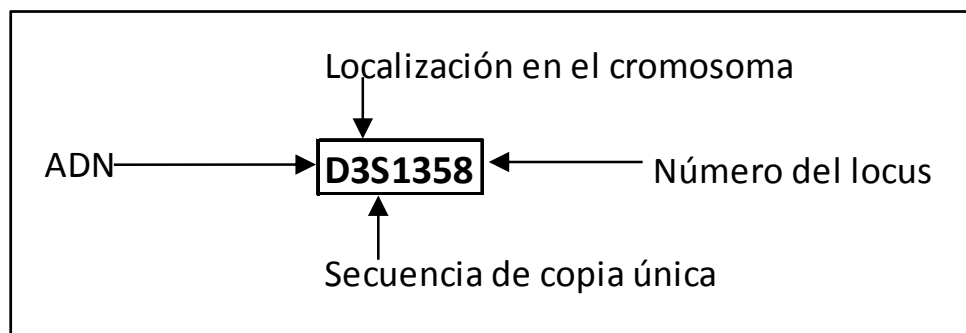


Ilustración 15. Nomenclatura del marcador D3S1358. Imagen modificada de (Caratachea, 2007).

Capítulo 4. Técnicas de estudio de ADN forense

Hasta fines de la década de 1970, la localización de los genes en los distintos cromosomas (*locus*) sólo era posible por medio de técnicas convencionales, como cruza genéticas que seguían los principios mendelianos. A partir de la década de

los ochenta, el material genético comenzó a estudiarse mediante las técnicas y herramientas moleculares que se mencionan a continuación.

4.1 Enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas, son componentes naturales de las bacterias que se caracterizan por cortar el ADN de manera selectiva, mediante el reconocimiento de sitios que presentan una secuencia dada de nucleótidos conocidos como sitios de restricción (Dragan & Moses , 2014) (Ilustración 16)

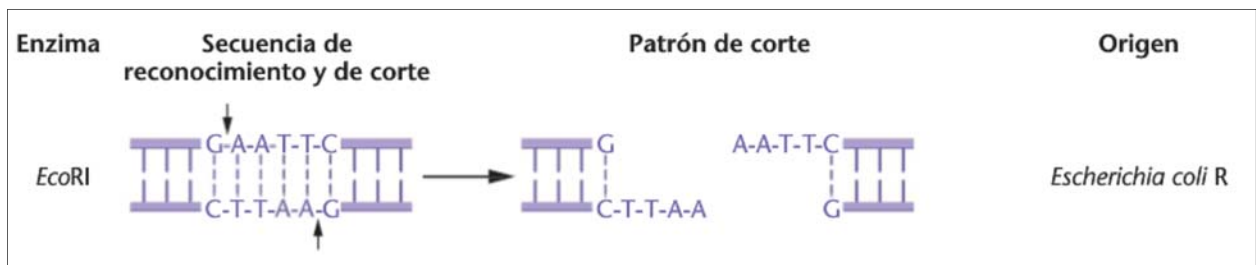


Ilustración 16. Enzima de restricción Eco RI en las imágenes se muestran como la enzima genera cortes internos en la molécula de ADN generando extremos cohesivos Imagen modificada de (Klung et al, 2013)

4.2 Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Los primeros marcadores moleculares basados en polimorfismos de la secuencia de ADN fueron los marcadores RFLPs (*Restriction fragment length polymorphisms*) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción éstos fueron los primeros marcadores moleculares utilizados para el desarrollo de mapas genéticos (Botstein, et al. 1980)

Estos marcadores se basan en la identificación de diferencias en el tamaño de fragmentos que son generados mediante restricción con endonucleasas. Para detectar estas diferencias es necesario, recurrir, tras la digestión, a un proceso de hibridación con una sonda marcada. Los polimorfismos surgen como consecuencia en la presencia de diferentes dianas de restricción o debido a diferencias en el tamaño limitado por dos sitios de restricción dados.

4.3 Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP)

Los polimorfismos AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), están basados en la longitud de los fragmentos amplificados, y pertenecen al grupo de marcadores moleculares multi-*locus* que permiten analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de éste (Simpson, 1997)

El análisis mediante AFLP consiste en la digestión completa del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguida de una amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debidos a mutaciones en la secuencia de ADN que se encuentra en, o cerca de los sitios de restricción. Posteriormente se analizan el patrón electroforético de los fragmentos de ADN amplificados que difieren en número y tamaño, este patrón es altamente específico y debido a la rigurosidad de la técnica es altamente reproducible (Simpson, 1997)

Los tipos de análisis que se pueden realizar con biomarcadores *multilocus* dominantes, se pueden separar en dos grupos principales: los poblacionales y los filogenéticos

4.5 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs)

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico, más conocida por el acrónimo en inglés RAPDs (*RADNOM Amplification of Polymorphic ADN*), es un tipo de marcador molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa. Los fragmentos de ADN obtenidos por medio de esta técnica se amplifican de regiones aleatorias del genoma ya que los iniciadores o primers de la reacción son secuencias arbitrarias de ADN sintético. Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990 (Williams, *et al.*, 1990)

A diferencia del análisis de PCR tradicional, el RAPD no requiere ningún conocimiento específico de la secuencia de ADN del organismo diana ya que: los 10 primers idénticos amplificarán o no un segmento de ADN, dependiendo en las posiciones que sean complementarias a la secuencia de los primers. Por lo tanto, si se ha producido una mutación en el ADN molde en el sitio que era previamente complementario al cebador, no se producirá un producto de PCR, d ADN como resultado un patrón diferente de segmentos de ADN amplificados en el gel. (Williams, *et al.*, 1990)

Esta tecnología ha sido utilizada para análisis de diversidad genética, el mejoramiento genético y la diferenciación de líneas clonales. (Ferreira. & Grattapaglia 1998) (Buso, *et al.*, 1998)

4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El desarrollo, en 1986 por Kary Mullis, de la PCR, revolucionó la biología molecular y las ciencias biomédicas, ya que ésta técnica permite amplificar con rapidez fragmentos cortos de ADN y con ello se pueden generar millones de copias de ADN a partir de cantidades muy pequeñas esto ha resultado de gran ayuda para el diagnóstico de muchas enfermedades genéticas. (del Castillo Ruiz, *et al.* 2012)

La amplificación del ADN se obtiene por ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales consta de tres estadios de temperatura distintos (Ilustración 17):

- a) Desnaturalización del ADN que actúa como molde para su ampliación de ADN a una temperatura de 94 a 96°C.

- b) Alineamiento. Los primers son oligonucleótidos, formados por moléculas de cadena simple de ADN, que son complementarios a ambos extremos de una secuencia determinada de ADN que actúa como molde o plantilla. Su función es indicarle a la polimerasa cuál es el ADN punto de partida para la polimerización. Este paso requiere una temperatura que varía entre los 42 a los 60°C.
- c) Elongación o extensión del *primer* por la ADN polimerasa. Los primers son extendidos de una cadena molde de ADN de cadena simple (previamente desnaturalizado). Gracias a la enzima ADN polimerasa, en presencia de desoxinucleótidos fosfato (dNTPs) y bajo condiciones adecuadas de la reacción, se lleva a cabo la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementario, a partir de las cadenas templado. Para este paso se requieren temperaturas entre los 60 y 72°C.

(Paz *et al.*, 2014).

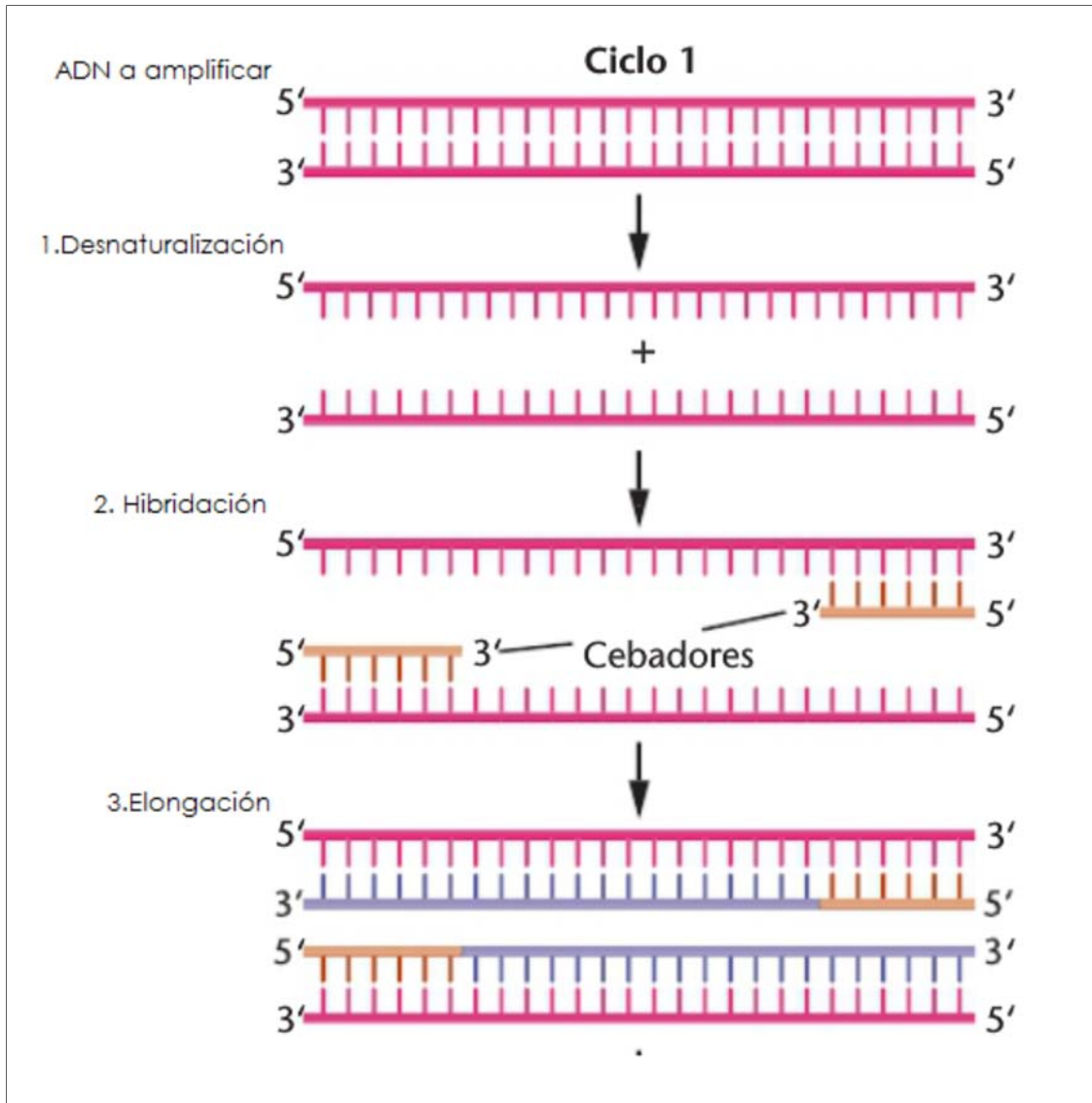


Ilustración 17. Etapas del ciclo de amplificación por PCR. Imagen modificada de (Klung et al, 2013).

Una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico. Por otra parte, la identidad del producto puede ser confirmada mediante hibridación con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de bases esté contenida en el fragmento de interés. (Cortazar & Silva, 2014) (Ilustración 18)

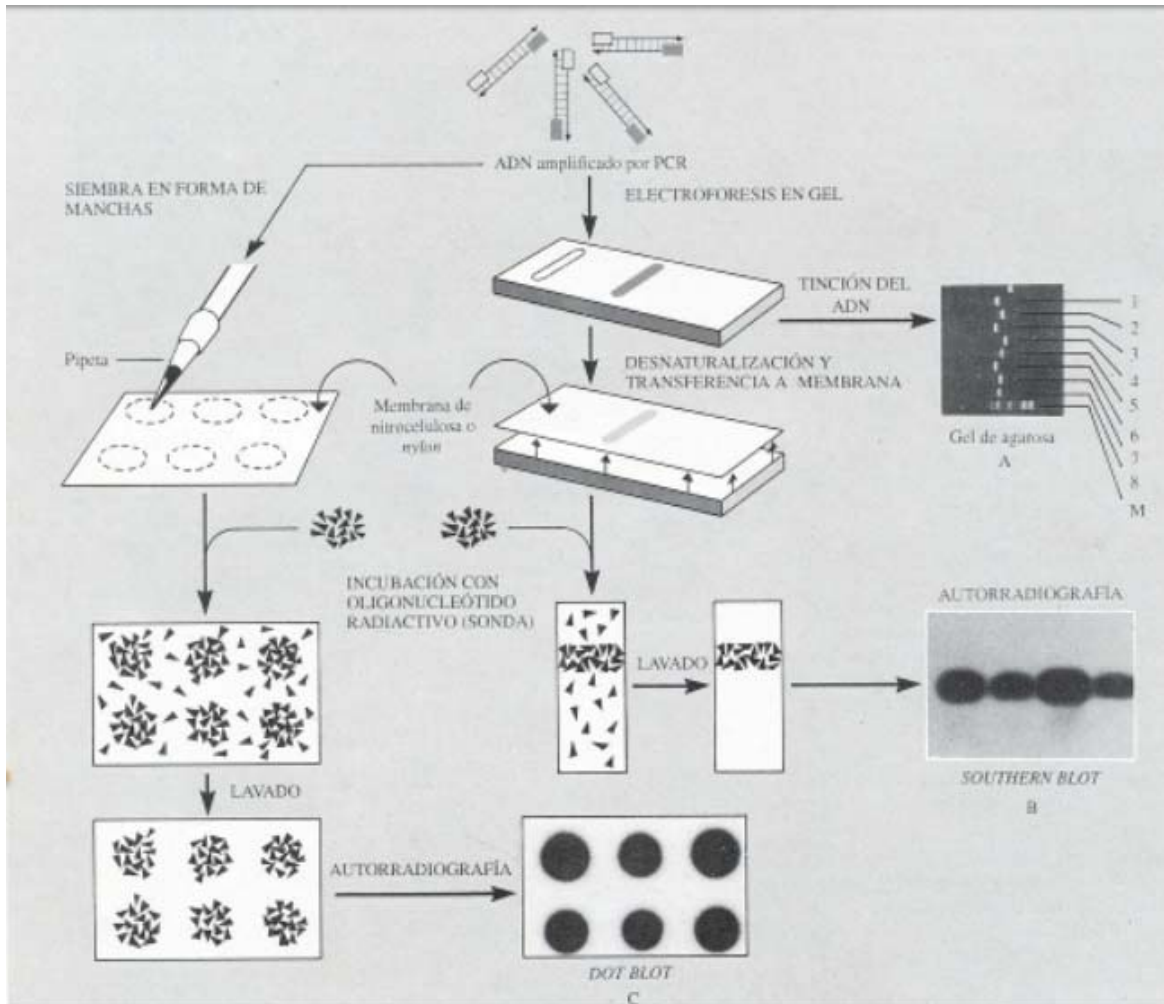


Ilustración 18. Tres Formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR A: visualización directa. Las muestras colocadas sobre un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migran de una manera característica que se puede visualizar por tinción (coloreado) del ADN. (Carriles 1-8: productos de distintas PCRs; carril M: marcadores de ADN de tamaño conocido.) B: Southern blot. El ADN es desnaturalizado (separación de sus hebras constituyentes) y transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon para luego incubar la hibridación (unión) con una sonda radiactiva. Ésta quedará fijada donde se encuentre el tramo de ADN de interés y su presencia se revelará a través de una autorradiografía (placa fotográfica sensible a la emisión radiactiva de la sonda). C: dot blot. Método análogo al anterior, pero practicado sobre una siembra en forma de manchas de los fragmentos de ADN a analizar previamente desnaturalizados. Imagen tomada de (Cortazar & Silva, 2014).

Para medir la efectividad de las condiciones experimentales se deben utilizar siempre dos controles: un control negativo, que tiene la mezcla pero sin ninguna cadena molde de ADN, que se usa como control de contaminación externa con otro ADN. Esta situación puede darse en dos momentos: a) En el laboratorio por contaminación cruzada y b) Contaminación asociada al escenario de donde proviene

la muestra y un control positivo que es un ADN estandarizado previamente, que se utiliza como indicador de que los componentes de la PCR no han fallado. (Cortázar & Silva 2014).

4.7 Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es una variación de la PCR estándar y es utilizada para la cuantificación de ADN o ARN mensajero de una muestra. Sus ventajas en comparación con la PCR tradicional son: la eliminación de la manipulación post-PCR, tiene mayor sensibilidad y especificidad, permite discriminar productos (dímeros de primers o bandas inespecíficas) mediante la curva *melting*, (Ilustración 19) ,cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de primers.

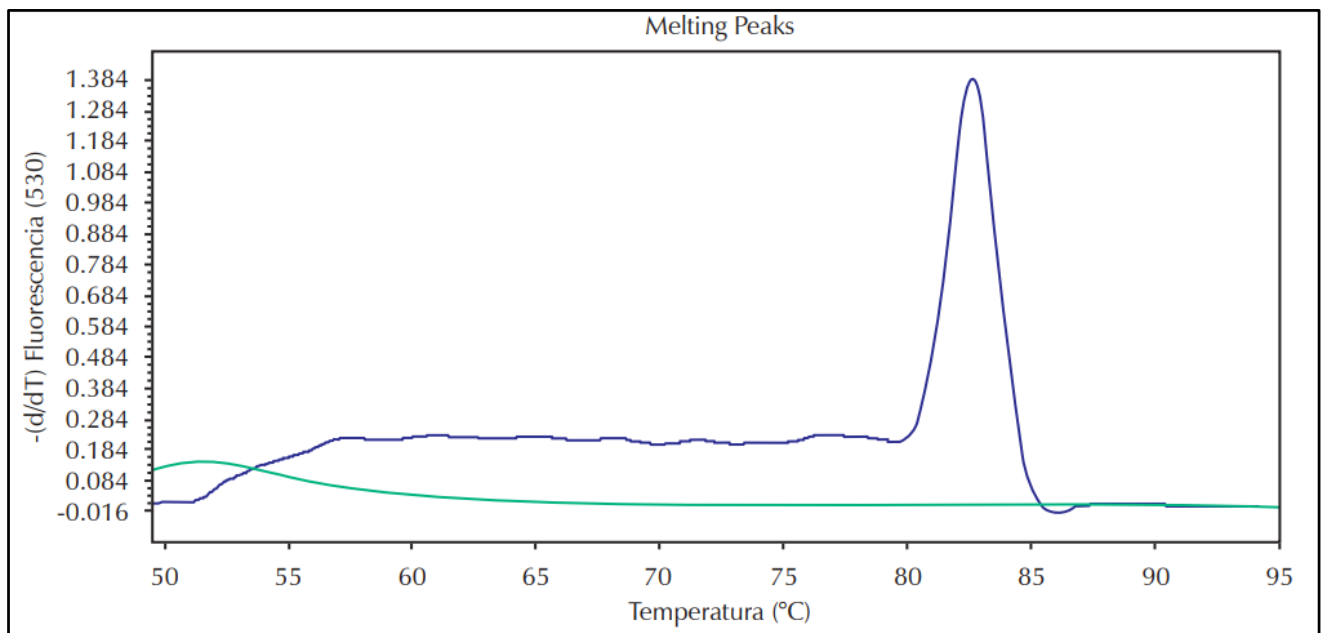


Ilustración 19. Curva melting se puede observar un único pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que las amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo (color verde) corresponde al control negativo, el cual no amplificó. Imagen tomada de (Tamay de Dios , Ibarra, & Velasquillo, 2013)

La qPCR tiene la capacidad de analizar múltiples productos de PCR, así como la expresión génica y el análisis de expresión de micro ARNs. Esto permite a su vez el genotipaje de poblaciones para determinar frecuencias polimórficas. Utilizando primers y sondas específicas de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad inicial de una determinada secuencia de ADN o ARN y esta cuantificación del material genético puede darse a través del análisis absoluto o relativo (Cortazar & Silva 2014). El análisis absoluto permite cuantificar una secuencia blanco y expresar el resultado final como un valor absoluto. Este análisis es muy utilizado en el análisis de múltiples STRs. En comparación el análisis relativo compara los niveles de una o varias secuencias blanco en una misma muestra, con respecto a con un control, y expresa el resultado final como el ratio de las secuencias de interés. La comparación de diferentes genes en una misma muestra se basa en la normalización de la expresión génica a través del uso de genes endógenos de mantenimiento (*housekeeping*). Este análisis es utilizado en oncología molecular. (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Cuando se combina la qPCR con una reacción de retro-transcripción (RT-PCR), puede determinarse la cantidad de ARN_m de una muestra mediante una cuantificación relativa, en la que se compara la cantidad del ARN_m de un gen específico respecto a la cantidad de ARN_m de un gen endógeno. Para la cuantificación se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de producto obtenido (ampliación, Esto se hace mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma específica o inespecífica, con una relación entre producto y fluorescencia. Los programas de análisis grafican dicha fluorescencia con respecto al número de ciclos (Ilustración 20) de forma tal que la cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ADN y ARN iniciales ($r = 1$), se espera que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores. (Paz *et al.*, 2014).

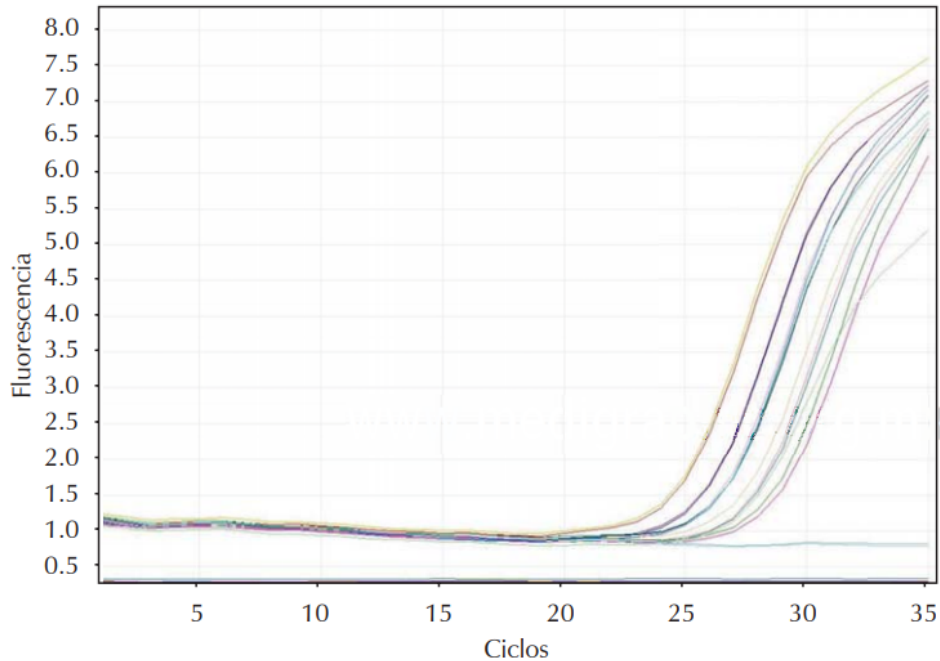


Ilustración 20. Curva de amplificación En el eje «Y» se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje «X» los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN. Imagen tomada de (Tamay de Dios , Ibarra, & Velasquillo, 2013)

4.8 Secuenciación de siguiente generación (NGS)

Esta técnica tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único estudio, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales.

El ADN se fragmenta y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos; Los fragmentos de ADN a continuación se amplifican clonalmente y se agrupan juntos para ser utilizados como entidades a secuenciar (*clustering*). Las secuencias cortas obtenidas se denominan lecturas o “reads” que son alineados contra una secuencia de referencia. Un aspecto importante en la NGS es el número de veces que cada base del genoma está presente en los “reads” de secuenciación producidos. Este valor se denomina profundidad de cobertura (*coverage*) y es uno

de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma. (Behjati & Tarpey, 2013).

Capítulo 5. Las ómicas relacionadas con la ciencia forense.

El término ómica proviene del inglés *Omics*, este término se emplea en biología molecular como sufijo y se refiere al estudio de la totalidad o del conjunto de algo. Las principales aplicaciones que existen son la genómica, la metabolómica, la metagenómica, la proteómica, la epigenómica, la lipidómica y la transcriptómica.

En particular la proteómica, la transcriptómica y la metabolómica se les agrupa bajo la denominación de genómica funcional. Todas las ómicas parten del análisis de un gran volumen de datos, por lo que se apoyan en la bioinformática así como en técnicas automatizadas de alto rendimiento (*high-throughput techniques*).

La genómica estudia a los genomas de los organismos, mediante la secuenciación del ADN y el análisis de las secuencias para encontrar genes y su comparación con secuencias genómicas de otros organismos.

La metagenómica, también llamada genómica de comunidades, es una rama de la genómica en la que se estudian los genomas de comunidades enteras de microbios, sin la necesidad de aislarlos previamente, esto ha constituido una gran ventaja ya que se han podido analizar muchos microorganismos que no se hubieran podido crecer.

La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, el conjunto de ARNs mensajeros transcrito presentes en una célula, tejido u organismo. De manera similar a los proteomas, los transcriptomas son muy variables, ya que muestran qué genes se están expresando en un momento dado.

La metabolómica es el estudio y comparación de los metabolomas o la colección de todos los metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo en un momento dado. Estos metabolitos incluyen a intermediarios del metabolismo, hormonas y otras moléculas de señalización, y a metabolitos secundarios.

La genómica es la -ómica que más ha evolucionado gracias a diversas ciencias, técnicas, descubrimientos y desarrollos tecnológicos que se encuentran entrelazados. Algunos acontecimientos relevantes para el campo se encuentran en la (Ilustración 21). En la ciencia forense el uso de la genómica ha beneficiado y ha aportado algunos avances en el área, como el fenotipado forense por ADN, el uso en la genética forense y las técnicas moleculares se ha vuelto invaluable hoy en día para obtener un veredicto.

En paralelo a la genómica el interés por otras ciencias se ha creado una con aplicación forense por ejemplo la farmacogenética y la toxicología forense ya que las respuestas a tratamientos farmacológicos pueden variar entre individuos debido a varios factores, siendo uno de ellos la presencia de polimorfismos en genes que codifiquen a proteínas implicadas en el metabolismo, el transporte del fármaco o que sean el objetivo de acción farmacológica. Los estudios farmacogenéticos han desempeñado un importante papel importante en el ámbito de la toxicología forense, ya que aportan información que puede auxiliar en la identificación de la causa y circunstancia de la muerte, especialmente en los casos en que las concentraciones de fármacos encontrados en los análisis toxicológicos post mortem son difíciles de interpretar. Esta información adicional sirve esencialmente para determinar si la muerte fue intencional o accidental. (Gomes de Pavia, 2014).

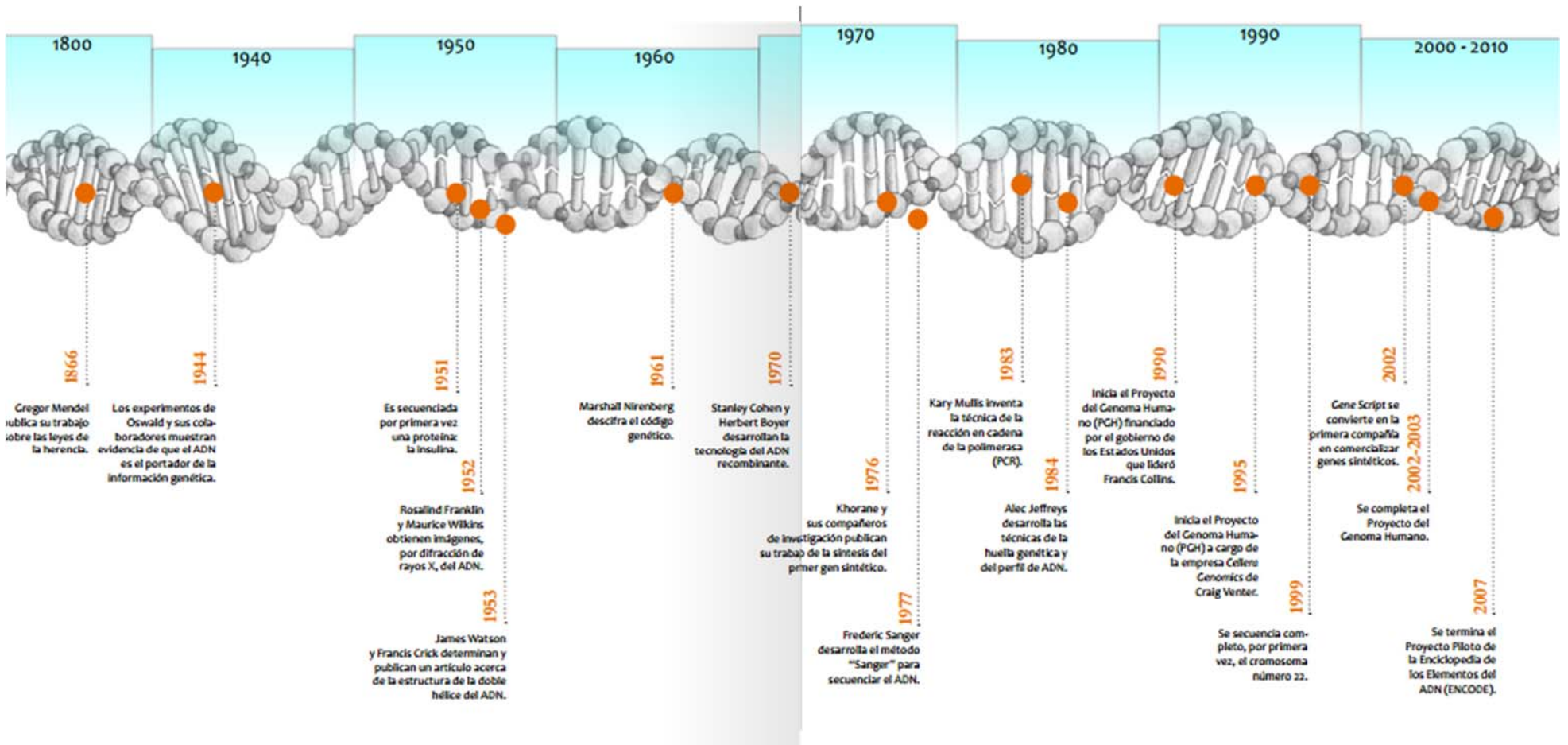


Ilustración 21. Línea del tiempo de ADN. Se muestran a grosso modo sucesos históricos para el campo de la genética. Tomada de (Rodríguez González, 2014).

Capítulo 6. Biomarcadores.

Los biomarcadores son moléculas que se pueden determinar en los tejidos y fluidos corporales mediante técnicas de laboratorio, y que según sus características, función y disponibilidad, nos facilitan los procesos de identificación. Los tipos de biomarcadores se pueden clasificar en: (Zanón-Moreno & Pinazo-Durán, 2016).

- Biomarcadores morfológicos.
Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura.
- Biomarcadores bioquímicos.
Se basan en la comparación de productos de expresión de diferentes genes. Estos pueden ser proteínas, como los antígenos eritrocitarios (grupos sanguíneos), enzimas eritrocitarias, proteínas plasmáticas y antígenos de Histocompatibilidad (HLA), son marcadores que se transmiten obedeciendo a las leyes mendelianas de la herencia.
- Biomarcadores genéticos.
Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen.

En la ciencia forense los primeros estudios de identificación humana se basaron en la información que se obtenía del grupo sanguíneo, proteínas e isoenzimas este tipo de marcadores tenían varios inconvenientes pues se degradan rápidamente, y tienen relativamente baja variabilidad e informatividad además se requiere una gran cantidad de muestra para hacer el análisis. Actualmente se utilizan biomarcadores genéticos en el como los STR autosómicos y STR de cromosoma Y y los SNP's (Ilustración 22) (Carracedo, 2013).

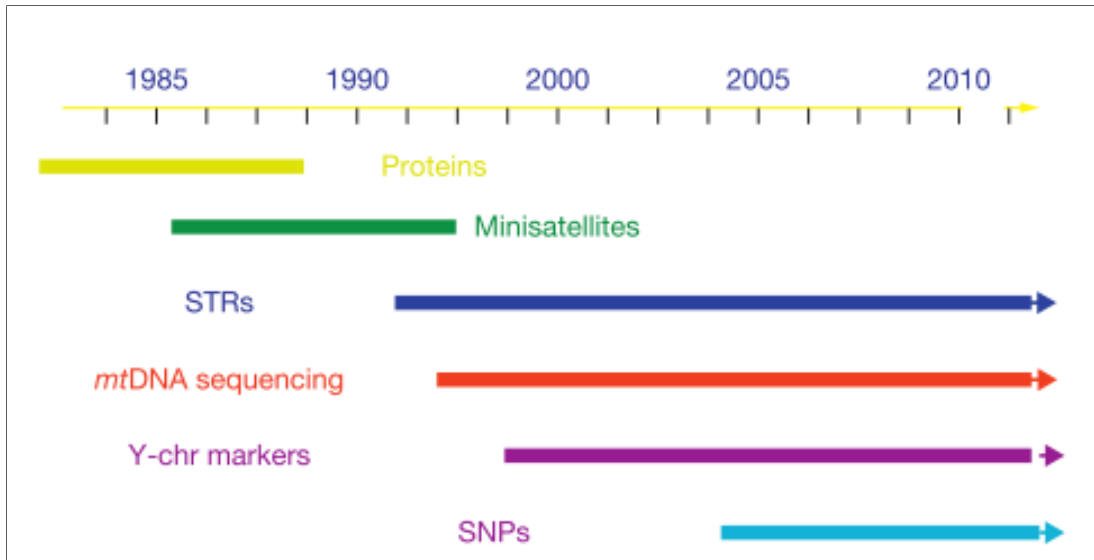


Ilustración 22. Biomarcadores más usados en genética forense Imagen tomada de Forensic Genetic: History (Carracedo, 2013).

6.1 Biomarcadores usados en genética forense.

En la genética forense se analizan las variaciones del genotipo en ciertos segmentos de ADN (polimorfismos) que son responsables de la variabilidad genética en la población humana y tiene como objetivo la identificación genética de personas.

A pesar de que hay un gran número de polimorfismos de ADN a lo largo del genoma para ser considerados como biomarcadores los polimorfismos deben de cumplir ciertas características: (Amorim & Budowle, 2017).

- Ser altamente polimórficos.
- Ser fáciles y baratos de caracterizar
- Ser simples de interpretar
- Tener una baja tasa de mutación
- Los resultados deben de ser fáciles de comparar entre laboratorios y deben ser reproducibles

Además una vez que se tiene identificado un polimorfismo como potencial biomarcador éste es sometido a una evaluación extensa y rigurosa antes de ser aceptados para su uso rutinario este proceso se denomina validación. (Amorim & Budowle, 2017).

6.2 Biomarcadores de ADN mitocondrial: ventajas y desventajas.

En genética forense los biomarcadores de ADN_{mt} se usan para proporcionar información antropológica sobre el linaje materno de los haplogrupos de ADN_{mt} , en los casos en los que la cantidad de ADN extraído es muy pequeña o degradada a menudo se opta por el análisis del ADN_{mt} también es frecuente el uso de ADN_{mt} para la evaluación de los perfiles de ADN de los restos humanos no identificados (Alessandrini *et al.*, 2012). Esto se debe en parte, a que el número de moléculas de ADN_{mt} en una célula es de hasta miles, en comparación con una sola copia de ADN nuclear además de que el ADN_{mt} es más resistente a la degradación debido a su estructura circular por lo que es más probable que se obtenga un resultado de tipificación de ADN usando ADN_{mt} que analizando ADN nuclear (Alessandrini, *et al.* 2012). Se ha reportado que la tipificación del ADN_{mt} tiene una tasa de éxito del 95% para la genotipificación e identificación de muestras esqueléticas en casos de personas desaparecidas.

Existen escenarios, como los desastres masivos y/o naturales, en los que el número de muestras biológicas recuperadas son tantas que los protocolos estándar de tipificación STR no darán resultados suficientes para obtener una identificación confiable, lo que hace necesario contar con técnicas alternativas para el análisis de ADN. Uno de estos métodos implica la secuenciación de ADN_{mt} sin embargo, al analizar el ADN_{mt} se debe de considerada la posibilidad de que múltiples restos son de individuos que están relacionados matrilinealmente, y solo con esta prueba sería incapaz de distinguir entre ellos. (Buckleton *et al.*, 2016).

Desde el 2009 se han compilado bases de datos de secuencias de ADN mitocondrial para evaluar la distribución y las frecuencias de las secuencias de HVR-I y HVR-II. Se han identificaron ciento diez sitios variables, en la región HVRI (nt16024-nt16365) se han

reportado 68 sitios polimórficos y 119 haplotipos. En la región HVR II (nt73-nt340), se observan 42 sitios polimórficos y 113 haplotipos. (Kang & *et al*, 2009)

Otro papel importante en el análisis del ADN mitocondrial es proporcionar evidencia en caso el ADN nuclear produce resultados negativos o cuando sólo se dispone de muestras relacionados con la vía materna. El propósito del análisis ADN_{mt} es proporcionar evidencia útil para una de las dos hipótesis alternativas: (Alessandrini *et al.*, 2012).

- La muestra (Q) pertenece al sospechoso (K) o individuos relacionados por vía materna;
- La muestra (Q) y la muestra sospechosa (K) no pertenecen a la misma persona (o línea materna).

Si los dos haplotipos (Q) y (K) son idénticos, entonces esto apoya la primera hipótesis. Si, por otro lado, las dos muestras son diferentes, esto apoya la segunda hipótesis. (Alessandrini *et al.*, 2012).

La desventaja del uso de esta prueba es cuando hay heteroplasmía aunque no necesariamente invalida el uso del ADN mitocondrial hace que el análisis sea más complejo y en el campo forense se pueden obtener resultados no concluyentes.

6.3 Biomarcadores de cromosoma Y: ventajas y desventajas

El cromosoma Y tiene la particularidad de ser transmitido de generación en generación sin sufrir cambios y de herencia exclusivamente paterna es por esto que es de gran interés tanto antropológico como médico-legal.

Actualmente en genética forense se analizan fundamentalmente haplotipos de STRs, secuencias satélites por análisis de heterodúplex, el minisatélite MSY1 por MVR-PCR (Variación en la secuencia de las repeticiones de los minisatélites mediante PCR), el gen SRY, este gen es uno de los más importantes para la genética forense, o también denominada TDF (factor de determinación del testículo) codifica para las proteínas que

causan el desarrollo de los testículos y está implicado en los procesos de desarrollo sexual masculino. (Lisker, *et al.*, 2013).

En la Tabla 1 se muestran los marcadores actuales que se analizan en el cromosoma Y entre sus aplicaciones se incluyen las pruebas de paternidad y diferentes aplicaciones en casos criminales, en particular para el análisis de delitos sexuales en muestras de ADN masculino en manchas que involucran mezclas de material genético Masculino Femenino (Díaz S, 2010).

| Designación del Locus | Unidades repetidas | Alelos |
|------------------------------|---------------------------|---------------|
| DYS389 I | [TCTG] | 10-18 |
| DYS456 | AATA | 13-18 |
| DYS390 | [TCTA] [TCTG] | 18-27 |
| DYS389 II | [TCTA] | 24-34 |
| DYS458 | GAAA | 14-20 |
| DYS19 | AGAT | 10-19 |
| DYS385a/b | TCTA | 7-25 |
| DYS393 | AGAT | 8-16 |
| DYS391 | TCTA | 7-13 |
| DYS439 | AGAT | 8-15 |
| DYS635 | [TATC] [TATG] | 20-26 |
| DYS392 | TAT | 7-18 |
| Y GAT H4 | TAGA | 8-13 |
| DYS437 | [TCTA] [TCTG] | 13-17 |
| DYS438 | TTTTTC | 8-13 |
| DYS448 | AGAGAT | 17-24 |

Tabla 1. STR del cromosoma Y y características de los biomarcadores Y-STR Imagen tomada de (Díaz S, 2010).

6.4 Biomarcadores STR autosómicos usados en genética forense: ventajas y desventajas.

Los STRs autosómicos son los más comúnmente usado en el ámbito forense pues estos están en todas las regiones del genoma, pero la mayoría se encuentra en regiones no codificantes y presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada por lo que en genética se dice que estas regiones presentan una alta heterocigosis (Alessandrini, *et al.* 2012). Además presentan una tasa de mutación más alta que los SNP's lo que permite estudiar la variación poblacional en tiempos evolutivos breves, (Qasim *et al.*, 2017), son multi-alélicos y se heredan de manera mendeliana simple (Lisker, *et al.*, 2013).

Una desventaja de los STR es que pueden presentar "tartamudez" que es el deslizamiento de la replicación que se observa in vitro durante la amplificación por PCR está "tartamudez" es responsable de crear 'bandas de tartamudeo' en el análisis de PCR, este tartamudeo son bandas más pequeñas que el verdadero alelo y que difieren en tamaño del producto principal. Esto puede complicar el análisis de los STRs, especialmente en análisis de ADN de mala calidad o cuando hay poca cantidad de muestras, así como en mezclas de dos o más contribuyentes. Es por eso que normalmente, los STR tetrameros (4 unidades de nucleótidos) en adelante son los adecuados para un análisis forense, aunque STR más grandes también podrían ser utilizados, debido a que mayor tamaño menor tartamudez, no son tan abundantes como los STR tetraméricos, por lo que los kits más usados en genética forense son los que tienen STR tetra- y pentámeros en su mayoría (Amorim & Budowle, 2017). Los kits de STR autosómicos más usados en genética forense se presentan en la Tabla 2.

| Nombre del kit Nombre del STR | AmpF ISTR Profiler Plus Loci | Qiagen's Investigator1 ESSplex Kit | PowerPlex® Fusion System | Identifilter | Microreader | Early Access STR Kit v1 |
|----------------------------------|------------------------------------|--|-----------------------------|--------------|-------------|----------------------------|
| CSF1PO | | | X | X | X | X |
| D3S1358 | X | X | X | X | | X |
| D5S818 | X | | X | X | | X |
| D7S820 | X | | X | X | | X |
| D8S1179 | X | X | X | X | | X |
| D13S317 | | | X | X | | X |
| D16S539 | | X | X | X | | X |
| D18S51 | X | X | X | X | | |
| D21S11 | X | X | X | X | | X |
| FGA [FIBRA] | X | X | X | X | | |
| TH01 [TC11] | | X | X | X | | X |
| TPOx | | | X | X | | X |
| Vwa | X | X | X | X | | X |
| D1S1656 | | X | X | X | X | X |
| D2S441 | | X | X | | | X |
| D2S1338 | | X | X | X | X | X |
| D10S1248 | | X | X | | | X |
| D12S391 | | X | X | | X | |
| D19S433 | | X | X | X | | X |
| D22S1045 | | X | X | | | |
| Plus SE33 [ACTBP2] | | X | | | | |
| Penta D | | | X | | | |
| DYS391 | | | | | | |

Tabla 2. Kits más usados en genética forense. Tabla modificada de (Ge, Eisenberg, & Budowle, 2012).

6.4.1 Base de datos CODIS.

El término CODIS hace referencia al Sistema de Índices Combinados de ADN, este sistema fue desarrollado en 1997 en Estados Unidos por el FBI (*Federal Bureau of Investigation*). El CODIS es una base de datos que contiene información a nivel local, estatal y nacional en tres rubros: perfiles de ADN personas condenadas, de indicios biológicos hallados en el lugar de los hechos y perfiles de ADN de personas desaparecidas. El objetivo de este sistema es permitir que se realice la confrontación de perfiles de ADN de un delito específico con todos los perfiles de ADN que se encuentran en la base de datos. Los perfiles que se depositan en este sistema están basados en 13 STRs autosómicos, que son biomarcadores más usados a nivel mundial (Dragan, Schanfield, & Marjanovic, 2014). (Ilustración 23).

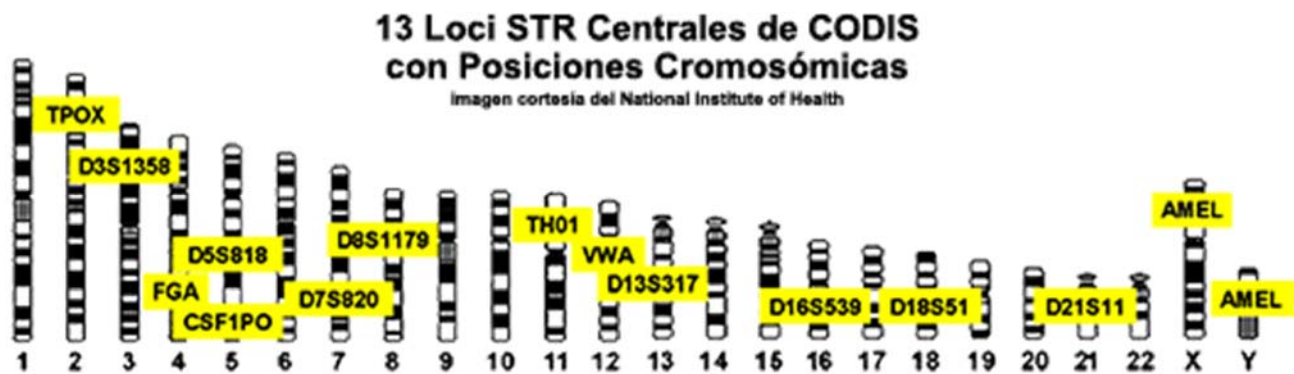


Ilustración 23. Core Loci del CODIS más AMEL Posición cromosómica de los STR loci. Tomado de Butler J.M. en *Forensic ADN Typing /Biology Technology ADN genetics of STR markers*

En la ciencia forense los STR desempeñan un papel importante pues el uso de estos biomarcador permite diferenciar el ADN de distintos individuos. Es por esto que el FBI anunció que se empezaría la validación del proyecto para agregar nuevos *loci* al CODIS. El grupo de trabajo encargado de este proyecto reportó que se tiene casi 14 millones de perfiles STR en el Sistema de Indexación de ADN con los 13 *loci* previamente usados como CODIS por lo que obliga a seguir usándolos en el nuevo CODIS. (Hares, 2015).

En el nuevo CODIS se incluyeron 7 nuevos *locus*, en esta nueva edición del CODIS los *locus* se dividen en *locus* requeridos y *locus* sugeridos. En la (Tabla 3) se enlistan algunas características generales de los nuevos biomarcadores añadidos al CODIS

| Marcador | Nombre oficial | Tipo de Gen | Localización | Tamaño | Observaciones |
|---|--|-------------|--------------|------------|--|
| D1S1656 Otros nombres: RGP4 SCZD9 Acceso Genebank: G07820 | Regulador de la señalización de la proteína G 4 | Codificante | 1q42 | 129-168 pb | · Se han reportado 13 alelos diferentes ^a · [TAGA] _n [TGA]0-1[TAGA] _n [TAGG]0-1[TG]5· STR altamente polimórfico, índice de heterocigocidad de más de 0,89 · Utilizado por la ENFSI y la EADNP · Utilizado para pruebas de paternidad, análisis de muestras forenses a partir de ADN degradado ^b · Se puede usar para generar datos de frecuencia de poblaciones y estudios antropológicos ^c |
| D2S441 Otros nombres: GF1 HGF NS4 GGF1 GINGF Acceso Genebank: AC079112 | Factor de intercambio de nucleótidos guanina Rac 1/SOS Ras | Codificante | 2p14 | 78-114pb | · Presenta una repetición sencilla TCTA de 8 o 9 ^d o 10 a 13 repeticiones ^e , seguido de un solo tetranucleótido TCAA, TTTA, o TCTG y terminando con una repetición adicional TCTA que varía de 10 a 17 repeticiones : [TCTA] _n [TNNN] [TCTA] _n ^f · Es utilizado para pruebas de paternidad y se ha reportado en estudios de MPS que su uso aumenta la diversidad alélica ^g y facilita la interpretación del parentesco |
| D2S1338 Acceso Genebank AC010136 | Desconocido | Desconocido | 2q35-q36 | 291-359 pb | · Localizado a 150 Mb del <i>locus</i> D2S441 · Presenta dos motivos TGCC Primer motivo ^j [TGCC] _{n=4-9} [TTCC] _{n=6-19}] ₁₀₋₂₆ Segundo motivo ^j [TGCC] _n [TTCC] _n [GTCC] [TTCC] · Útil para análisis de paternidad ^h · Mayor sensibilidad en muestras degradadas que kits tradicionales donde suelen haber pérdida alélica (<i>drop-out</i>) o reducción de la sensibilidad de la prueba en los alelos de mayor tamaño ^k |
| D12S391 Otros nombres: CHLC.GATA 11 HO8. Acceso Genebank G08921 | Desconocido | Desconocido | 12 | 209-253 pb | · Los loci D12S391 no están en desequilibrio de ligamiento en el población general; Por lo tanto, las frecuencias genotipo puede multiplicarse porque no hay una fuerte asociación entre los loci en el examen de individuos no relacionados ^l · [AGAT] _n [AGAC] _n [AGAT] _m · El NGS detecta muchos más alelos que la PCR ya que muchos alelos del D12S391 tienen la misma longitud pero diferentes composiciones de secuencia en la región de repetición ⁿ |
| D10S1248 Acceso Genebank AL391869 | Desconocido | Desconocido | 10q26.3 | 79-123 | · Motivo [GGAA] ₁₃ ^o · Se ha demostrado que ayuda a la solución de casos complejos de parentesco donde se encuentran inconsistencias genéticas ^p · Es un marcador con alto desempeño gracias su alto poder de discriminación y su alto contenido de información polimórfica (PIC) ^q |
| D19S433 Acceso Genebank G08036 | Desconocido | Desconocido | 19q12 | 106-146 pb | · Motivo [AAGG] [AAAG] [AAGG] [TAGG] [AAGG] _n ^r · Este loci, ha demostrado ser útil debido a su gran número de alelos basados en la longitud y aunque no tiene una alta discriminación a través de la secuenciación hay una mayor frecuencia de esta mutación para la población Asiática ^s |
| D22S1045 Acceso Genebank AL022314 | Desconocido | Desconocido | 22q12.3 | 79-115 pb | · Motivo [ATT]14 ACT [ATT]2B10:G20 · Este loci contribuye a la caracterización de la estructura genético poblacional, y es eficiente en la tipificación de muestras óseas degradadas ^u |

Tabla 3. Características de los nuevos 7 loci del core CODIS 20 (ENFSI) European Network of Forensic Sciences Red Europea de Ciencias Forenses (EADNP) European ADN Profiling Group: Grupo Europeo de Perfilamiento de ADNMPs Massive parallel sequencing Método de secuenciación masiva a. (Lareu, Barral, Salas, Pestoni, & Carracedo, 1998) b. (Piglionica & Baldassarra, 2013)c. (Hossain, et al., 2016) (Chen, et al., 2016) (Li, et al., 2017)d. (Gettings, et al., 2015) e. (Coble & Butler, 2005) f. (Gettings, et al., 2015) (Phillips, y otros, 2011) g. (Jin, et al., 2016)h. (Xueying, et al., 2016)i. (Kline, Hill, Decker, & Butler, 2011) (Henrich, Felske-Zech, Brinkmann, & Hohooff, 2005) j. (Henrich, Felske-Zech, Brinkmann, & Hohooff, 2005)k. (Butler Gettings, Aponte, Vallone, & Butler, 2015)l. (Budowle, Ge, Chakraborty, Eisenberg, & Green, 2011) (O'Connor, Hill, Vallone, J.M. Butle-, & J.M. Butle, 2011)m. (Phillips, y otros, 2011)n. (Gerald, Rockenbauer, Dalsgaard, & Børst, 2014)o. (Gettings, et al., 2015).p. (Vullo, 2009).q. (Herzog, Agustin, & Puschel, 2007)r. (Henrich, Felske-Zech, Brinkmann, & Hohooff, 2005) (Wang, Zhao, Ye, Liu., & Chen., 2014) s. (Mizuno, 2008)t. (Butler, Shen, & McCord, 2003)u. (Coble & Butler, 2005).

Este nuevo conjunto de 20 *Loci* se implementó a partir del primero de enero del 2017. Las ventajas sobre el CODIS anterior son:

- Reducir el número de falsos positivos en las coincidencias ya que el nuevo CODIS 20 tiene una probabilidad de coincidencia para individuos no relacionados en el orden de 10^{-20} (Qasim *et al.*, 2017) en comparación al CODIS 13 donde la probabilidad de coincidencia para individuos no relacionados es superior al orden de 10^{-15} . (Zauza-Carrasco *et al.*, 2015).
- Aumentar la compatibilidad internacional entre bases de datos de países europeos (*European Standard Set, UK Core Loci, Interpol Standard Set of Loci*) (Zauza-Carrasco *et al.*, 2015)
- Incrementar el poder de discriminación para los casos de personas desaparecidas y criminales. (Qasim *et al.*, 2017)
- Eficacia para identificar genéticamente individuos de poblaciones mestizas como es el caso de la población mexicana ya que este nuevo conjunto *loci* aporta al CODIS altos valores de discriminación, de poder combinado de exclusión y poder medio de exclusión. (Burguete-Argueta, *et al.*, 2016)

La nueva clasificación del CODIS 20 divide a los *locus* en *locus* requeridos (A) y *locus* sugeridos (B). Se consideraron los 13 *loci* del CODIS anterior como *loci* requeridos con una excepción del *locus* TPOX que este se encuentra en la clasificación de *locus* sugerido, (Tabla 4) (Hares, 2015) además se incluyeron los *loci* obligatorios que se analizan en otros países, (Tabla 5), y otros *loci* que estaban contenidos en estuches comerciales de tipificación de ADN.

| | Sección A (requerida) | Sección B (sugeridos) |
|--------------|--|----------------------------------|
| Locus | Amelogenin D18S51 FGA D21S11 D8S1179 vWA D13D317 D16S539 D7S820 TH01 D3S1358 D5S818 CSF1PO D2S1338 D19S433 D1S1656 D12S391 D2S441 D10S1248 DYS391 | TPOX D22S1045 SE33 |

Tabla 4. Nuevo Core del CODIS Se muestra en color Rojo los marcadores del 13 core CODIS original, en color azul para identificar a los nuevos 7 loci que se adicionaron al core CODIS y en color negro los loci que están en kits de tipificación y que también forman parte de los perfiles genómicos Tabla modificada de (Hares, 2015)

| <i>Locus</i> | CODIS 13 | European Estandar Set (ESS) | European Estandar Set expandido (ESS) | CODIS 20 |
|--------------------|----------|-----------------------------|---------------------------------------|----------|
| CSF1PO | x | | | A |
| D3S1358 | x | x | x | A |
| D5S818 | x | | | A |
| D7S820 | x | | | A |
| D8S1179 | x | x | x | A |
| D13S317 | x | | | A |
| D16S539 | x | | x | A |
| D18S51 | x | x | x | A |
| D21S11 | x | x | x | A |
| FGA [FIBRA] | x | x | x | A |
| TH01 [TC11] | x | x | x | A |
| TPOx | x | | | B |
| Vwa | x | x | x | A |
| D1S1656 | | x | x | A |
| D2S441 | | x | x | A |
| D2S1338 | | | x | A |
| D10S1248 | | x | x | A |
| D12S391 | | x | x | A |
| D19S433 | | | x | A |
| D22S1045 | | x | x | B |
| Plus SE33 [ACTBP2] | | | x | B |
| DYS391 | | | | A |

Tabla 5. Loci usados en los diferentes paneles internacionales. Para el panel core CODIS 20 "A" denota que el estudio del loci es obligatorio y "B" denotan que el estudio del loci es opcional; X denota que el locus está en el panel Tabla adaptada de (Hares, 2015).

6.5 Biomarcadores de Polimorfismos de nucleótido simple (SNP's).

Al tener una mayor resolución estos biomarcadores, se puede revelar de una forma completa la variación que existe entre los seres humanos y entre distintas poblaciones; en particular es posible identificar variantes raras de SNP's, es decir aquellas cuya frecuencia alélica se encuentra dentro del intervalo del 0.5-5%. Se han propuesto y validado una variedad de paneles SNP para diferentes aplicaciones forenses, ya que se ha descubierto que las diferencias de frecuencia en las poblaciones son particularmente útiles para predecir el origen geográfico de los individuos a partir de material biológico. Por ejemplo: La composición genética del mexicano es compleja debido a que por

factores sociales, demográficos y económicos la distribución alélica no es equilibrada en nuestra población general y cambia de acuerdo a la región geográfica analizada (Rangel-Villalobos *et al.*, 1999). En términos generales, se considera que la población mexicana es mestiza. Para que un individuo sea considerado como mestizo debe haber nacido en México, tener un apellido de origen español y ancestros de origen mexicano tres generaciones hacia atrás. (Gorodezky *et al.*, 2001).

Se ha considerado a la estimación de la ascendencia biogeográfica mediante ADN como parte del fenotipado de ADN forense (FDP). A pesar de que la ascendencia genética no siempre está representada por una característica externa visible, particularmente en individuos de ascendencia genética mixta, se ha planteado que algunos rasgos pueden ser informativos acerca de características relacionadas con la ancestría de un individuo. En particular se han llevado a cabo estudios sobre el color de ojos, de cabello y de piel. (Kayser & Knijff, 2011).

Los SNP's también pueden utilizarse cuando se trata de muestras degradadas que tienen bajas cantidades de ADN porque pueden amplificarse y analizarse en fragmentos más cortos que los métodos de análisis para STR. (Taylor *et al.*, 2016).

Aunque los SNP's son abundantes en todo el genoma, que es una de las ventajas de este tipo de marcador de ADN, el análisis de SNP's aún no ha sustituido la genotipificación STR, en parte debido a su menor poder de discriminación por *locus*. El hecho de que la mayoría de los SNP's son bialélicas disminuye su informatividad por *locus* y de hecho, alrededor de 50 SNP's son necesarios para obtener el mismo poder de discriminación que 12-15 STRs. (Taylor *et al.*, 2016).

6.5.1 Uso de biomarcadores SNP's para determinación de características físicas.

En un caso criminal se plantea la pregunta. ¿Cuál es la apariencia física del sospechoso? sexo, color, altura, peso etc.

La determinación del sexo es una de las características de análisis rutinario de los laboratorios forenses ya que se pueden saber debido a la diferencia entre el cromosoma X y Y. sin embargo, casi todas las características físicas se pueden considerar complejas de estudiar y hasta el momento se sabe muy poco de cuáles son los mecanismos que determinan la apariencia física de una persona. Sin embargo, los recientes avances tecnológicos basados en el estudio de SNP se han convertido en un método de elección para el reconocimiento de genes implicados en la determinación de características físicas (Casado & Guillen, 2010).

6.5.2 Uso de SNP's para la predicción de color de ojos.

Hace una década se publicaron los dos primeros estudios sobre la predicción del color del iris basado en el ADN. Utilizando 33 SNP's del gen OCA2 (encargado de regular la producción de melanina), el grupo de Frudakis y colaboradores lograron clasificar el 8% de los colores de los ojos estudiados (Frudakis, , Terravainen, & Thomas , 2007). En estudios posteriores, se realizaron estudios de asociación del genoma completo GWAS (por sus siglas en ingles *Genome wide association study*), éste se centró en evaluar los rasgos de pigmentación humana mediante el uso de 9 SNP's de 6 regiones genómicas (SLC24A4, KITLG, 6p25.3, TYR, OCA2-HERC2 y MC1R). Este reporte permitió identificar por asociación y de manera significativa el color de ojos entre varios miles de Europeos. (Sulem, *et al.*, 2007).

En el 2008 se reportó el gen HERC2 (regulador de OCA2) como el gen más importante para la determinación del color de los ojos. En particular, los SNP's rs12913832 y HERC2 rs916977 se plantearon como principales biomarcadores que pueden determinar del color de ojos (Sturm *et al* , 2008) (Eiberg *et al* , 2008) (Kayser *et al*, 2008).

En el 2013, se demostró que la inclusión del alelo rs1129038 de HERC2, mejora la predicción del color de ojos intermedios (verde-avellana) (Ruiz, Allwood, & Harbison, 2013). Utilizando este alelo se logró predecir con mayor certeza el color de ojos verde-avellana en individuos de América, Medio Oriente y Asia Occidental para las cuales el kit IrisPlex, en el que no está incluido este marcador, predijo ojos marrones (Freire-Aradas, *et al.*, 2014)

6.5.3 Uso de SNP's para el análisis de color de cabello

La primera prueba de ADN que permitió predecir el color del cabello fue publicada en 2001. Los autores utilizaron el gen MC1R, que codifica para el receptor de la hormona estimulante de los melanocitos y está relacionado con el color de pelo rojo y demostraron, en un protocolo, que al usar 12 variantes de ADN del gen MC1R se puede identificar eficazmente a los individuos pelirrojos. En este protocolo se logró identificar al 96% de individuos pelirrojos en el estudio. (Grimes *et al*, 2001).

El primer intento de predicción de ADN para todos los colores de cabello categóricos se publicó en 2007 como parte del proyecto de pigmentación GWAS de Sulem y colaboradores. Utilizando 2 SNP's de MC1R (rs1805008 y rs1805007), los autores pronosticaron el cabello rojo con un 70% de éxito. (Sulem, *et al.*, 2007)

El primer sistema de prueba de ADN para predecir todos los colores de cabello en combinación con predicción de color de ojos, se desarrolló y publicó en 2013. Este sistema se conoce como HirisPlex. Está conformado por 24 SNP's, incluidos los 6 SNP's del kit IrisPlex, además tiene 11 SNP's de MC1R incluyendo un indel, Y152OCH, N29insA, rs1805006, Rs11547464, rs1805007, Rs1805008, rs1805009, rs1805005, rs2228479, rs1110400 y rs885479; Dos de SLC45A2, rs28777 y rs16891982; Uno de KITLG, rs12821256; Uno de EXOC2, rs4959270; Uno de IRF4, rs12203592; Dos de TYR, rs1042602 y rs1393350; Uno de OCA2, rs1800407; Dos de SLC24A4, rs2402130 y rs12896399; Uno de HERC2, rs12913832; Uno de ASIP PIGU, rs2378249; Y uno de TYRP1, rs683. Se probó en 1500 individuos de tres partes de Europa, el 80% de las muestras (n = 1243) se utilizaron para el modelado del color del cabello y el 20% (N = 308) para la validación del modelo. Utilizando una guía de predicción del color del cabello basada en los umbrales de probabilidad, se obtuvieron las predicciones correctas en 80% de los individuos de color de cabello rojo, 87,5% para individuos de color de cabello negro, 78,5% para individuos de color de cabello marrón y 69.5% para los individuos de color de cabello rubio. (Walsh *et al* , 2013).

6.5.4 Uso de SNP's para la predicción de color de piel

Comparado con la predicción del color de ojos y del cabello, el conocimiento para esta característica es menor, ya que la población mundial es muy heterogénea.

En 2014, se publicó el primer estudio de predicción del color de la piel investigando 59 SNP's previamente asociados con el color de piel, ojos y cabello. Los autores identificaron un subconjunto de 29 SNP's que estaban más correlacionados con la variación del color de la piel en sus muestras. Estos 29 SNP's proporcionaron una separación de la mayoría de los individuos de piel de color blanco de la mayoría de los individuos de piel de color trigueño negro en un análisis de componentes principales (PCA). (Maronas *et al* , 2014).

Otros SNP's, que son usados en la predicción del color de la piel son: SLC45A2 rs16891982, SLC24A5 rs1426654, KITLG rs10777129, ASIP rs6058017, TYRP1 rs1408799 y OCA2 rs1448484, SLC45A2 rs13289, SLC24A4 rs2402130, TPCN2 rs3829241 y ASIP rs6119471; los dos primeros sugeridos para la predicción del color de la piel por estudios previos (Hart *et al* , 2013) (Spichenok *et al* , 2011) (Valenzuela *et al*, 2010)

6.5.5 Uso de SNP's para la predicción de edad.

Conocer la edad aproximada de una persona desconocida, ciertamente puede proporcionar pistas en una investigación. Los métodos genéticos anteriormente propuestos para la estimación de la edad humana, eran la acumulación de deleciones dependiente de la edad o de ADN_{mt} o de acortamiento de los telómeros, mostraron baja precisión y varios problemas técnicos, por lo que se consideran inadecuados para aplicaciones forenses (Meissner & Ritz-Timme, 2010). Recientemente, la metilación del ADN se ha usado como un biomarcador candidato, en particular la metilación en islas CpG la predicción de la edad. Por ejemplo, destacan tres genes promotores: EDARADD, TOM1L1 y NPTX2; El estudio reveló que los patrones de metilación de los genes TOM1L1 y EDARAD disminuyó con la edad, y NPTX2 demostró un aumento progresivo.

El modelo de regresión para estimar la edad de los fluidos se construyó utilizando unas pocas citosinas de estos *loci*. Tal modelo predeciría la edad de la muestra biológica al utilizar dos marcadores CpGs con una precisión de aproximadamente 5 años (Bocklandt, et al., 2011).

Capítulo 7. Perfil genómico.

El perfil de ADN es único de cada persona, ya que cada uno de nosotros muestra un conjunto de valores alélicos distintos. Sólo los gemelos idénticos presentan el mismo perfil genético. Para la prueba de identidad forense, se compara un perfil de ADN con otros perfiles de ADN de muestras biológicas recuperadas en la escena de crimen o muestras de individuos conocidos (muestra de referencia) o con bases de datos. (del Castillo Ruiz, *et al.* 2012) (Ilustración 24)

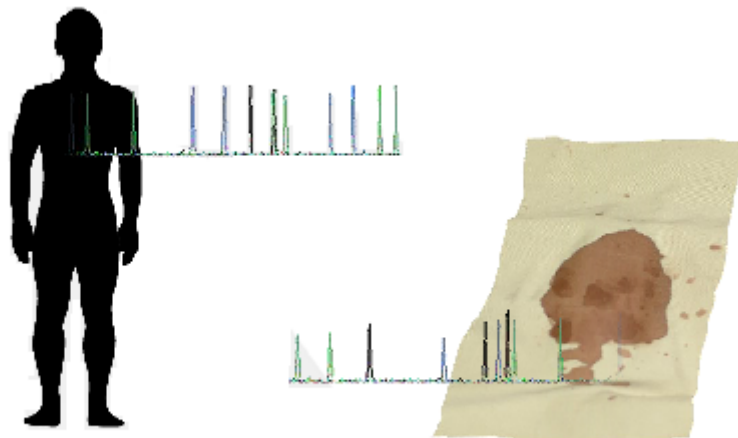


Ilustración 24. Perfil genético. Imagen modificada de (Klug et al., 2013).

La mayoría de los perfiles de ADN forenses de seres humanos se realizan actualmente utilizando kits comerciales que amplifican STR. En los kits Cada conjunto de cebadores está marcado con uno de cuatro colorantes fluorescentes, azul, verde, amarilla o rojo. Cada conjunto de cebadores está diseñado para amplificar fragmentos de ADN, cuyos tamaños varían dependiendo del número de repeticiones existente dentro de la región amplificada (Klug *et al.*, 2013)(Ilustración 25)

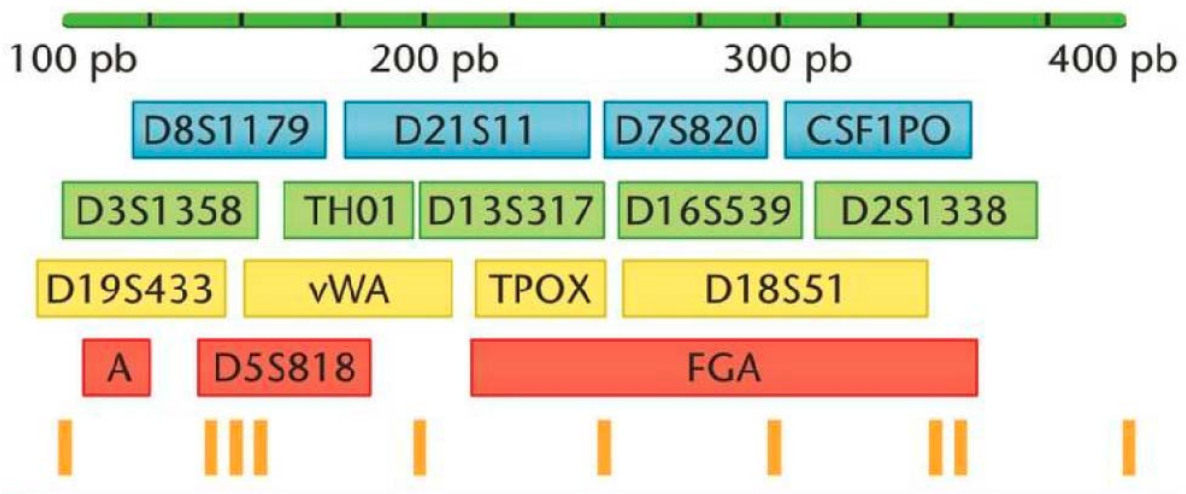


Ilustración 25. Rangos de tamaños relativos y colores de marcado mediante colorante fluorescente para 16 productos STR generados mediante un kit de obtención de perfiles de ADN comercialmente disponible. Los fragmentos de ADN que se muestran en naranja en la parte inferior del diagrama son marcadores del tamaño del ADN. El locus AMEL se indica mediante la letra A. (Del kit AmpFLSTR Identifier). Imagen tomada de (Klug et al., 2013).

Después de la amplificación, la muestra de ADN contendrá una pequeña cantidad de la muestra de ADN original utilizada como molde y una gran cantidad de productos de amplificación marcados con fluorescencia. Los tamaños de los fragmentos amplificados se miden mediante electroforesis capilar. Este método utiliza finos tubos de vidrio que se rellenan con un gel de poliacrilamida similar al que se utiliza en la electroforesis en gel sobre placa. La muestra de ADN amplificada se carga en la parte superior del tubo capilar y se hace pasar una corriente eléctrica a través del tubo. Los fragmentos de ADN con carga negativa migran a través del gel hacia el electrodo positivo, de acuerdo con sus respectivos tamaños. Los fragmentos cortos se mueven más rápidamente a través del gel, mientras que los de mayor tamaño se mueven de manera más lenta. En la parte inferior del tubo, un láser detecta cada fragmento fluorescente a medida que va realizando su migración. Los datos son analizados mediante un software que calcula tanto los tamaños de los fragmentos como sus cantidades, representándose esos datos como picos en una gráfica. (Klug et al., 2013)(Ilustración 26).

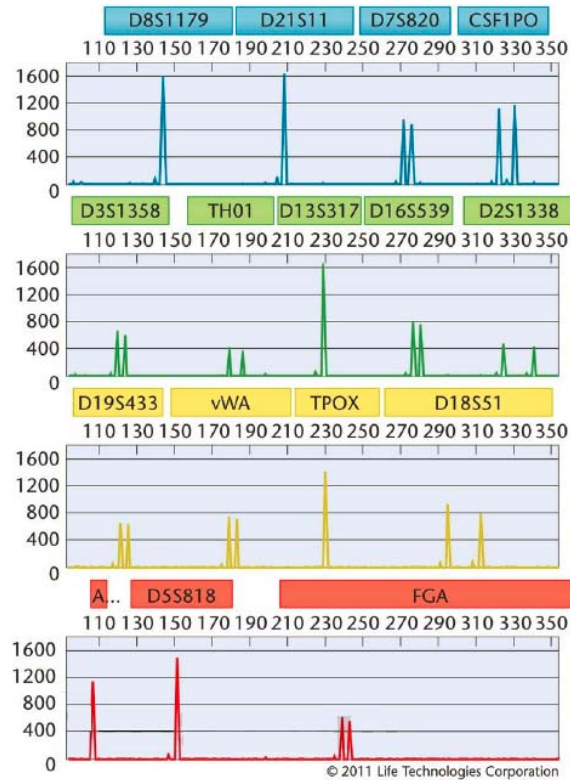


Ilustración 26. Un electroferograma que muestra los resultados de un análisis de un perfil de ADN utilizando el kit de perfiles STR de 16 loci de la Ilustración 25. Los loci heterocigóticos se muestran como picos dobles y los loci homocigóticos como picos simples de mayor altura. Los tamaños de cada alelo se pueden calcular a partir de las posiciones de los picos en relación con el eje de tamaños mostrado en la parte superior de cada gráfica. El único pico del locus AMEL (A) indica que este perfil de ADN corresponde a una mujer. Imagen tomada de (Klug et al., 2013).

El genotipo del perfil STR de un individuo se expresa como el número de veces que se repite la secuencia STR. Al interpretar los perfiles STR se utiliza estadística, probabilidades y genética de poblaciones y se pueden obtener los siguientes resultados: (Klug et al., 2013)(Ilustración 27).

- Inclusión o coincidencia: Al comparar una muestra conocida con una muestra de prueba si los dos perfiles son iguales se le llama una inclusión o una coincidencia.
- Inconcluso o no concluyentes: A veces no se puede llegar a una conclusión sobre si un individuo conocido está incluido o excluido como fuente de evidencia de ADN. Los resultados no concluyentes o no interpretables pueden deberse a

factores que complican el análisis tales como múltiples contribuyentes, contaminación o degradación de las muestras.

- Exclusión o no coincidencia: Al comparar una muestra conocida con una muestra de prueba, el donante de la conocida queda excluido como fuente de la evidencia si los perfiles son diferentes. Esto se conoce como una exclusión o una no coincidencia.

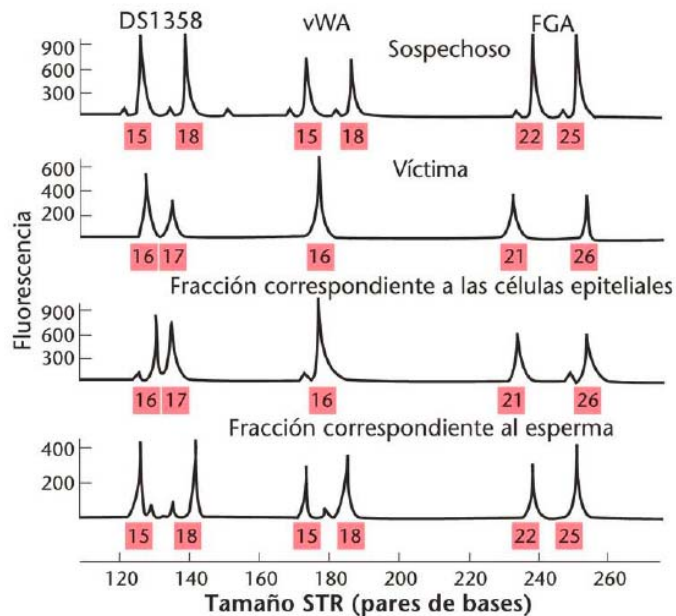


Ilustración 27. Electroferograma que muestra los perfiles STR de cuatro muestras de un caso de violación. Se examinaron tres loci STR a partir de muestras tomadas de un sospechoso, de una víctima y dos fracciones de un frotis vaginal realizado a la víctima. El eje x muestra la escala de tamaño de ADN, mientras que el eje Y indica la intensidad relativa de fluorescencia. El número situado debajo de cada alelo indica el número de repeticiones en cada alelo, medidas de acuerdo con la escala de tamaño de ADN. Observe que el perfil STR de la muestra de esperma tomada de la víctima se corresponde con el del sospecho en este caso el resultado reportado sería inclusión o coincidencia de perfiles Imagen tomada de (Klug et al., 2013)

Capítulo 8. Fuentes potenciales de pruebas de ADN para pruebas forenses.

Las evidencias biológicas forenses pueden estar en diferentes formas y estados en la escena del crimen y es muy importante que cada muestra deba ser vista como un fenómeno individual para que sea examinado cuidadosamente. La mayoría de los

procesos de obtención de ADN son adaptados para cada tipo de muestra biológica a evaluar.

Las muestras biológicas que se pueden ser usadas como fuentes potenciales de ADN se describen a continuación

8.1 Dientes.

Los dientes y sus raíces son estructuras que soportan traumatismos, agresiones por fuego, por ácidos ó el paso del tiempo, manteniéndose íntegros, y los dientes son reservorios de la pulpa dental que puede servir para pruebas de ADN lo que los hace una de las mejores fuentes de ADN (Lorente, M, Acosta, JA, & Villanueva, 1996). La composición única de los dientes y su ubicación en la mandíbula proporcionan protección adicional al ADN en comparación con los huesos, lo que los convierte en una fuente preferida de ADN en muchos casos. Se ha investigado sobre la fuente óptima de ADN en el diente y se sabe que la pulpa se encuentra la mayor fuente de ADN nuclear y en la dentina se puede obtener ADN_{mt} (Higgins & Austin, 2013)

8.2 Huesos.

Restos humanos que consistían solamente en huesos, han sido exitosamente identificados gracias a la caracterización del ADN.

El hueso es una de las mejores fuentes de ADN a partir de restos humanos descompuestos. Incluso cuando la carne se ha descompuesto, a menudo se puede obtener ADN del hueso desmineralizado. A pesar de que los huesos antiguos son una buena fuente de ADN, hay una gran dificultad para cuantificar y caracterizar la cantidad de ADN recuperada. (Ruiz M. , 2003).

8.3 Saliva.

La detección de la saliva se basa en la presencia de enzima amilasa pues esta enzima está presente en la saliva, por lo que su hallazgo aporta importante información en la investigación del hecho delictivo. A pesar de que la saliva carece de ADN, está inmersa en un medio lleno de células epiteliales que se desprenden constantemente y que llegan a formar parte de la misma por lo tanto es fácil obtener el ADN de este tipo de muestra biológica. (Dragan *et al* , 2014).

8.4 Sangre.

La sangre es uno de los fluidos biológicos que se encuentran con mayor frecuencia en la mayoría de delitos violentos, por lo que su estudio es invaluable. Desde el punto de vista del análisis de ADN, los glóbulos rojos no tienen valor porque no contienen ADN. Sin embargo, son extremadamente importantes en las pruebas para la presencia de hemoglobina, que es la base de la mayoría de las pruebas para la detección de sangre como evidencia biológica en la escena del crimen. (Fisher & Fisher , 2012).

La purificación de ADN en este tipo de muestras es difícil porque la sangre es una mezcla compleja que contiene células, proteínas, metabolitos etc. Más del 99% de las células de la sangre son eritrocitos, que no tienen núcleo y, por lo tanto, carecen de ADN. El ADN de la sangre debe de aislarse de los leucocitos (0.3% del total de las células sanguíneas) y debe de estar libre de contaminantes que interfieran en métodos posteriores; por ejemplo, la presencia del grupo hemo provoca una fuerte inhibición de la Taq polimerasa durante el proceso de PCR. Una mancha de sangre del tamaño de una moneda pequeña, correspondiente a unos 50 microlitros, tiene suficiente ADN para un análisis típico de VNTR. (Dragan & Moses , 2014).

8.5 Semen.

Es el fluido masculino de mayor importancia como vestigio en los casos de delitos sexuales. Está compuesto por espermatozoides (10%), plasma seminal (90%), leucocitos y células epiteliales; posee capacidad de fluorescencia, contiene altas concentraciones de fosfatasa ácida y de antígeno específico de próstata (proteína p30 o PSA) estas proteínas sirven como marcadores bioquímicos (Stoilivic, 1991) .El ADN de la cabeza de los espermatozoides es habitualmente la fuente más importante de ADN como prueba del delito sexual. Para liberar el ADN de las cabezas de los espermatozoides se requieren métodos de extracción especiales. En consecuencia, las muestras de ataque sexual se pueden extraer de forma diferencial: la primera extracción proporciona principalmente el ADN de células epiteliales de la víctima, mientras que la segunda extracción rinde principalmente ADN del semen. Un parámetro muy importante en el análisis de las evidencias de semen es el tiempo transcurrido desde la eyaculación la esperanza de vida del esperma después de la eyaculación depende de las circunstancias pero como referencia no máximo a 3 días. (Dragan *et al* , 2014).

8.6 Cabello.

El pelo cubre casi toda la superficie cutánea, presentando variaciones de color, cantidad y longitud, según la región anatómica, el sexo y la raza. La parte más alejada del cuero cabelludo está formada por células que tienen ocupado su citoplasma totalmente por una proteína estructural llamada queratina que da su forma al pelo. Por tanto, en esta zona distal, las células carecen de núcleo y de ADN. Sin embargo, en la zona proximal (bulbo o raíz), el pelo presenta células nucleadas totalmente activas que contienen ADN nuclear pero generalmente sólo contienen trazas de ADN nuclear altamente fragmentado. Los cabellos son fuentes relativamente ricas de ADN_{mt} por lo que es análisis preferido para este tipo de muestra. (Taylor *et al.*, 2016).

Capítulo 9. Métodos de obtención de ADN para fines forenses.

El enfoque para obtener el ADN de los restos depende del estado, la cantidad y la exposición del material biológico. Los métodos de obtención de ADN en el área forense se pueden categorizar en 4 tipos:

Categoría 1: Restos que muestran relativamente pocos signos de descomposición

En el examen post mortem generalmente será posible obtener muestras de sangre de los órganos internos y los tejidos blandos pues no estarán afectados. Como la sangre y los tejidos blandos son fuentes de ADN, se puede obtener un perfil de ADN (Taylor *et al.*, 2016).

Categoría 2: Restos que exhiben descomposición parcial

Generalmente, en el examen post-mortem no hay sangre disponible y los tejidos pueden presentar signos de putrefacción. En esta situación, la focalización de tejidos más profundos suele ser la opción. La contaminación del extracto por productos de descomposición generalmente afecta cuando inhibir el análisis por PCR por lo que normalmente las muestras de tejido requieren tratamiento adicional para liberar el ADN y purificarlo de los desechos celulares y otros productos de descomposición. (Taylor *et al.*, 2016)

Categoría 3: Estado avanzado de descomposición

Si los restos están en un estado tan avanzado de descomposición, la obtención de un perfil de ADN a partir de tejidos licuados rara vez es exitoso. La médula ósea a veces puede estar mejor conservados y puede proporcionar suficiente ADN. Sin embargo, si el perfil de la médula no tiene éxito, entonces se debe recurrir a estructuras esqueléticas

Categoría 4: Restos que son completamente esqueléticos (incluyendo restos momificados o desecados)

En esta etapa de descomposición generalmente sólo estructuras resistentes tales como hueso, cabello, uñas y los dientes estarán disponibles. Las estructuras esqueléticas, la

matriz ósea y la pulpa dental son ricas en ADN_{mt} pero también contienen cantidades bajas, pero tipificables de ADN nuclear. Dado que el ADN está "encerrado" dentro de una masa calcificada endurecida requiere procedimientos especiales para liberarla y purificarla.

Aunque se han desarrollado numerosos métodos para la extracción de ADN la integridad de la muestra es de máxima importancia por esta razón es extremadamente importante y de ser posible extraer el ADN de restos humanos por métodos no invasivos o sin destruir el material biológico. (Bolnick, 2012).

9.1 Extracción de ADN para tejidos en descomposición.

El procedimiento conocido como PK-SDS por sus siglas en inglés *proteinase K sodium dodecyl sulfate*, en la ciencia forense es uno de los más usados para la extracción de ADN ya que la digestión de la muestra se puede realizar con proteinasa K que es activada por el dodecil sulfato de sodio. La proteinasa K inactiva las DNAsas presentes en el lisado celular usando detergente aniónico el SDS. (Komski, 2014).

El protocolo más común es usar una solución que contenga proteinasa K, dodecil sulfato de sodio y DTT seguida de una solución orgánica limpieza con fenol o fenol cloroformo. Utilizando precipitación con etanol o microfiltración purifica el ADN. (Taylor *et al.*, 2016).

Otro método muy usado en investigaciones forenses consiste en impregnar una matriz de celulosa con productos químicos que permitan la lisis celular y posterior conservación del ADN. Para esto se unen tampones, agentes quelatantes, sales, detergentes y moléculas con gran absorbancia en el UV para proteger las muestras de los radicales libres que pueden formarse por exposición a la luz solar. Siguiendo este procedimiento las muestras pueden ser conservadas por un largo período de tiempo, lo cual es muy útil para la resolución de casos forenses y también tiene utilidad para la determinación de especies en un fluido corporal como puede ser un virus o una bacteria. (Komski, 2014).

9.2 Extracción de ADN de dientes y huesos.

El material de partida preferido es un diente molar preferiblemente libre de amalgama o aproximadamente 1 g de hueso denso (no esponjoso). En primer lugar, la superficie del diente o hueso se limpia para eliminar la contaminación de la superficie. Esto se hace a menudo lijando la superficial de hueso o, en el caso de un diente, por inmersión ácida transitoria seguida de un lavado. A continuación, el diente o el hueso deben ser pulverizados. Se emplean generalmente dos métodos: primero utiliza equipo de molienda de hueso en la cual un pedazo de hueso está en un vial con una barra de metal pesado. El vial se sumerge en nitrógeno líquido para hacer que el hueso se haga frágil. Después se aplica un campo magnético oscilante. Esto hace que la barra de metal vibre violentamente, pulverizando el hueso en un polvo fino. El mismo efecto puede lograrse utilizando una broca, pero se debe tener cuidado para evitar la generación de altas temperaturas como resultado de la fricción. Una vez que se ha producido un polvo fino, el ADN se libera por digestión enzimática usando una solución de *Proteinase K*, DTT y Tween 60. El extracto resultante está contaminado con sales de calcio éstas se eliminan con una mezcla concentrada de EDTA. Finalmente, el extracto se limpia y se concentra por microfiltración. Los rendimientos del ADN nuclear son típicamente bajos y, a menudo, se debe de usar un número elevado de ciclos PCR (> 28 ciclos) para obtener resultados (Taylor *et al.*, 2016).

Un factor limitante en la investigación genética de vestigios es encontrar el ADN poco preservado pero esta técnica de extracción es comúnmente usada y generalmente el ADN obtenido es analizado por NGS para tener mejores resultados. (Damgaard, *et al.*, 2015)

9.3 Extracción de restos óseos por métodos no invasivos.

Un factor limitante para el estudio de ADN de piezas antropológicas es que no siempre permiten el estudio de ADN antiguo (ADN) de restos óseos humanos porque la extracción de un ADN requiere normalmente la destrucción de al menos algún material esquelético.

Para minimizar el daño a los especímenes valiosos, se usa un método no destructivo para extraer el ADN de restos humanos antiguos. Este método puede usarse tanto con los dientes como con el hueso, pero preserva la integridad estructural de los estos materiales biológicos. Usando este método, es posible extraer el ADN mitocondrial y nuclear de humanos.

Antes de la extracción de ADN, cada muestra se sumerge en hipoclorito sódico al 6% p/v (blanqueador de alta resistencia), se enjuaga con agua de calidad HPLC y se irradiaron con luz ultravioleta para eliminar la contaminación superficial. Cada muestra se transfiere después a un tubo cónico se incuba toda la noche con solución de extracción (EDTA 0,5 M y 0,25 mg mL⁻¹ de proteinasa K, pH 8,0) con agitación suave. En la solución de extracción se coloca el diente u hueso previamente lavado y posteriormente el ADN se purifica usando sílices (Bolnick, 2012).

9.4 Intercambio aniónico para la extracción de ADN del lisado celular.

La cromatografía en fase sólida de intercambio aniónico se basa en la interacción que se establece entre los grupos fosfatos cargados negativamente del ADN y la matriz molecular con que se compacta la columna. Esta interacción hace que las moléculas de ADN queden retenidas en la fase estacionaria de la columna y puedan separarse de las proteínas y demás metabolitos presentes. Luego añadiendo una alta concentración de sales a la fase móvil se logra eludir el ADN, que si es necesario es precipitado con alcohol para futuras aplicaciones, si no puede utilizarse directamente disuelto en el buffer con sales en el que se elude. Este método tiene la ventaja de evitar el uso de disolventes orgánicos tóxicos y es más simple que los que requieren precipitación de otros componentes para su separación del ADN. (Komski, 2014)

9.5 Tecnología de microfluidos.

La tecnología de microfluidos utiliza una red de canales y pocillos que han sido grabados en vidrio (conocidos como chips). Estos chips sometidos a presión y a un campo eléctrico

hacen que los volúmenes, tanto del polímero como de las muestras, migren de forma controlada a través de los canales. (Cajal, 2016).

La tecnología de chips permite la manipulación, mezcla, dilución, electroforesis y separación cromatográfica de muestras tanto de ADN, ARN como proteínas, utilizando volúmenes muy pequeños por lo que este método puede ser usado en para la ciencia forense ya que obtienes un análisis de la calidad y/o cantidad de ADN, ARN en determinada muestra (Cajal, 2016).

Capítulo 10. Micro ARN como biomarcador potencial en genética forense

Para el estudio de casos forenses se han propuesto nuevos marcadores que podrían auxiliar en el análisis de indicios. Uno de estos marcadores es el ARN forense, en particular los microARNs (ARN_{mi} o miARN por sus siglas en inglés); los ARN_{mi} son moléculas de ARN de una sola cadena cuya longitud oscila entre 21 y 25 nucleótidos. Se ha descrito que están involucrados en la regulación de la expresión de otros genes mediante un proceso conocido como ribointerferencia. (Pillai, 2005)

La primera descripción de los ARN_{mi} se realizó en 1993 por Lee y colaboradores (Feinbaum, Ambros , & Lee, 1993), sin embargo, el término "microARN" se acuñó hasta el año 2001 en un conjunto de tres artículos publicados en la revista Science (Ruvkun , 2001). En el año 2008 mediante análisis bioinformáticos realizados por IBM, se estimó que existen alrededor de 50.000 miARN diferentes en el genoma humano. (Glasser, 2008)

En el campo de la genética forense, recientemente se ha propuesto el uso de los miARNs para la identificación de individuos, en particular para la identificación de fluidos corporales, ya que estos parecen tener una mayor especificidad sobre las pruebas bioquímicas existentes. El análisis de ARN es de particular valor para las ofensas sexuales, donde puede haber una mezcla de fluidos corporales múltiples de diferentes personas. (Uchimoto *et al.*, 2013).

Dada la baja calidad de muchas muestras forenses, parece aconsejable, sustituir el uso de ARN mensajero (ARN_m) por micro-ARN (miARN), que es mucho menos susceptible a la degradación. Sin embargo, la detección y cuantificación de miARN mediante PCR cuantitativa requiere una estrategia de normalización forense relevante y sólida. (Sauer, *et al.*, 2014).

A partir de protocolos altamente estandarizados utilizando metodologías contemporáneas se han encontrado algunos ARN_{mi} potenciales, en particular SNORD48, SNORD24 y RNU6-2 como referencias endógenas, ya que estos exhiben los niveles de expresión más estables con la menor variación entre los genes de referencia c ADNidatos que fueron evaluados en un conjunto de tejidos de órganos forenses relevantes incluyendo la piel (Sauer, *et al.*, 2014).

Para las muestras de sangre y saliva se han investigado diferentes biomarcadores para estos fluidos, los más sobresalientes han sido *hsa-miR-451* y *hsa-miR-205* ya que los resultados indican una alta expresión de *hsa-miR-451a* en sangre y una baja expresión en saliva, en comparación *hsa-miR-205* cuyo patrón de expresión es muestra una alta expresión de en la saliva pero no la sangre, por lo tanto, sugieren especificidad en lo que se refiere a los dos fluidos corporales, los resultados indican que estos dos marcadores son más que suficientes para distinguir entre sangre y saliva (Omelia, Uchimoto, & Williams, 2013).

11. Conclusiones.

El desarrollo de la genómica y los análisis asociados a este campo, le ha permitido a la ciencia forense tener nuevas herramientas para la resolución de casos, revolucionado al campo de la genética forense y al estudio de la misma creando nuevas soluciones a partir del conocimiento que se tiene de la molécula del ADN. Actualmente es posible correlacionar una muestra biológica con un sospechoso, o, en el caso en el que no haya sospechoso disponible, es posible proporcionar posibles perfiles de referencia usando las bases de datos de ADN y se ha reportado también que el análisis del ADN posibilita la identificación de individuos así como calcular la edad de un cuerpo o su origen biogeográfico.

Se ha demostrado que el análisis de suficientes biomarcadores genéticos puede proporcionar un perfil de ADN que estadísticamente sea único y que se pueda asociar a solo una persona, por lo que es necesario el uso de una base de datos nacional que nos permita tener un registro parecido al CODIS.

Los biomarcadores más usados en la actualidad son los STRs autosómicos, STRs cromosómicos de cromosoma Y, SNP's de ADN_{mt} SNPs autosómicos. El análisis de éstos, ha permitido establecer que son elementos extraordinariamente útiles en la identificación humana y en el mapeo genético, debido a su elevado polimorfismo, tasa de mutación relativamente baja, tamaño pequeño y ubicación cromosómica conocida. Además, varios de estos marcadores pueden amplificarse mediante una PCR ya sea de forma simultánea (multiplex) o individual y/o el análisis de Secuenciación de nueva generación (NGS).

Actualmente la genotipificación está basada en STRs por lo que el análisis de éstos es esencial para el estudio de casos; dado que las grandes bases de datos de ADN están establecidas con perfiles de STR de los delincuentes y muestras de los casos sin resolver es poco probable que estos marcadores sean desplazados por otros en el futuro inmediato. Sin embargo, la mayoría de los nuevos estudios se centran en los SNP's, pues estas repeticiones se presentan con mayor frecuencia en el genoma que los STR.

Además los SNP's presentan potencial para hacer modelos faciales que son de gran interés en el área forense, ya que brindan predicciones faciales, sexo, color de ojos, cabello y piel que actualmente estas predicciones se hacen a través de fotomontaje o mezcla de imágenes.

Para proponer e implementar un nuevo biomarcador se deben tomar en cuenta la reproducibilidad, sensibilidad, especificidad, facilidad de uso y relación costo/efectividad adecuado de dicho biomarcador. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo son cruciales para el futuro de campo ya que el estudio nuevos marcadores de ADN y metodologías permitirá llevar a cabo reformas en los protocolos forenses a partir de los cuales se puedan obtener datos validados para que garanticen conclusiones correctas.

Es imposible calcular el impacto a largo plazo de los descubrimientos e intervenciones en la genética forense que están siendo desarrollados y probados, ya que esta disciplina trabaja conjuntamente con otras áreas y ámbitos en la asistencia para la impartición de justicia.

Bibliografía.

- Alessandrini, F., Mazzarini, L., Onofri, V., Oniri, N., & Turchi, C. (2012). *Introducción a la Genética forense*. Milan : Springer.
- Amorim, A., & Budowle, B. (2017). *Handbook of Forensic Genetics: biodiversity and Heredity in Civil and criminal Investigation*. London: World Scientific.
- Anderson, S., Bankier, A., Barrel, B., de Bruijn, M., Coulson, A., Drouin, J., . . . Schreier, P. (1981). Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature*, 457-465.
- Bates, A., Turner, P., & White, M. (2014). *Biología molecular*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Behjati, S., & Tarpey, P. (May de 2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.*, 236-238. Obtenido de Fichas Técnicas, procedimientos Experimentales y Metodologías ofrecidas a nuestros usuarios: http://www.uco.es/scai/pdf/Fichas_Tecnicas_SCAI-UCO_v3.pdf
- Betticher DC, T. N., Altermatt HJ, H. P., & Ryder WD, H. J. (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*, 11:1005-1011.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, E., Sánchez, F., Sinsheimer, J., Horcath, S., & Vilain, E. (2011). Epigenetic predictor of age,. *PLoS One* 6, e14821.
- Bolnick, D. A. (2012). Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 293-300.
- Botstein, D, White, R.L, Skolnick, M., & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*,, 314-331.
- Buckleton, J., Brigh, J.-A., & Taylor, D. (2016). *Forensic DNA Evidence Interpretation*. Boca Raton : Taylor & Francis.
- Budowle, B., Ge, J., Chakraborty, R., Eisenberg, A., & Green, R. (2011). Population genetic analyses of the NGM STR loci. *Int. J. Legal Med.* 125, 101-109.
- Burquete-Argueta, N., Martínez De la Cruz, B., Camacho-Mejorado, R., Santana, C., Noris, G., López-Bayghen, E., . . . Gómez, R. (2016). Forensic-paternity effectiveness and genetics population analysis of six non-CODIS mini-STR loci (D1S1656, D2S441, D6S1043, D10S1248, D12S391, D22S1045) and SE33 in Mestizo and Amerindian populations from Mexico. *ANNALS OF HUMAN BIOLOGY*, 563-571.

- Buso, G., Rangel , P., & Ferreira, M. (1998). Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology* 7, 107-117.
- Butler Gettings, K., Aponte, R. A., Vallone, P. M., & Butler, J. M. (2015). STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Science International: Genetics* 18, 118–130.
- Butler, J., Shen , Y., & McCord , B. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2003, 1054-1064.
- Butler, JM, & Hill ,CR. (2012). Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic Sci Rev* 24, 15-26.
- Cajal, R. (2016). *Fichas técnicas y procedimientos experimentales y metodologías ofrecidas a nuestros usuarios*. Obtenido de Servicio Central de Apoyo a la Investigación: http://www.uco.es/scai/pdf/Fichas_Tecnicas_SCAI-UCO_v3.pdf
- Caratachea, M. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Naciobal de Enfermedades Respiratorias*, 213-221.
- Carracedo, A. (2013). *Forensic Genetics: History*. España: University of Santiago de Compostela .
- Casado, M., & Guillen, M. (2010). *ADN forense: problemas éticos y jurídicos*. universidad de barcelona.
- Chen , J., Xie, B., Yang , Y., Yang , M., Liu C, & Lv , Y. (2016). Genetic variability and forensic efficiency of 39 microsatellite loci in the Li ethnic group from Hainan Island in the South China Sea. *Ann Hum Biol*, 1-8.
- Coble, M., & Butler, J. (2005). Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. 50, págs. 43-53.
- Coble, M., Andersen, M., Buckleton , J., & Duncan , T. (2016). Non- Autosomal Forensic Markers. En J. Buckleton, J.-A. Brighth, & D. Taylor, *Forensic DNA Evidence Interpretation* (págs. 315-352). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Cortazar, A., & Silva , E. (2014). *Métodos físicos -químicos en biotecnología*. CDMX: UNAM - Instituto de biotecnología.
- Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E., & Allentoft, M. (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific Reports*, 5, 22284.
- Database of single nucleotide polymorphisms. (2017). *Database of single nucleotide polymorphisms*. Obtenido de Database of single nucleotide polymorphisms: <http://strbase.nist.gov/>

- del Castillo Ruiz, V., Uranga Hernández, R., & Zafra de la rosa, G. (2012). *Genética Clínica*. México: Manual Moderno SA de CV.
- Díaz S, L. F. (2010). análisis de 17 loci de STR de cromosoma Y en las poblaciones de bogota y sabtander con fines genéticos. *Pontificia U Javeriana*, 53.
- Dragan, P., & Moses , S. (2014). *Forensic DNA applications an interdisciplinaru perspective*. Boca Raton : Taylor & Francis.
- Dragan, P., Schanfield, M., & Marjanovic, D. (2014). Basic Genetics and Human Genetic Variation. En P. Dragan, & M. Schanfield, *Forensic DNA Applications* (págs. 23-26). Boca Raton : Taylor & francis.
- Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Mengel-From, J., & Kiaer, K. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression,. *Hum. Genet.*, 123, 177-187.
- Feinbaum, R., Ambros , V., & Lee, R. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75, 843-854.
- Ferreira, M.Y., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. *EMBRAPA-CENARGEN*,, 38-56.
- Fisher, A., & Fisher , D. (2012). *Techniques of Crime Scene Investigation*. . Boca Raton,: Taylor & Francis .
- Freire-Aradas, A., Ruiz, Y., Phillips, C., Maroñas, O., Sochtiq, J., Tato, A., . . . del Cal, M. (2014). Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. *Forensic Sci. Int. Genet.* 13, 3-9.
- Frudakis, , T., Terravainen, T., & Thomas , M. (2007). Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors. *Hum Genet*, 122, 311-326.
- Ge, j., Eisenberg, A., & Budowle, B. (2012). Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investigative Genetics*, 1-14.
- Geraldi, C., Rockenbauer, E., Dalsgaard, S., & Børst, C. (2014). Second generation sequencing of three STRs D3S1358, D12S391 and D21S11 in Danes and a new nomenclature for sequenced STR alleles. *Forensic Sci. Int. Genet.* 12, 38-41.
- Gettings, K., Kiesler, K., Faith, R., Guerrier, R., Young, B., Baker, C., & Montano, P. (2015). Sequence variation of 22 autosomal STR loci detected by next generation sequencing . *Manuscript submitted*.
- Glasser, V. (2008). Tapping miRNA-Regulated Pathways. *Genetic Eng Biotech News*, vol 28 no 5.
- Gomes de Pavia, A. (2014). *Farmacogenética em Toxicología Forense*. Tesis.

- Gorodezky, C A C, Vazquez-Garcia, MN, de la Rosa, G, Infante, E., Balladares, S, Toribio, R, & Perez-Luque , E. (2001). The genetic structure of Mexican Mestizos of different loCations: Tracking back their origins through MHC genes blood group systems, and microsatellites. *Human Immunology*, 979-991.
- Grimes , E., Noake, P., Dixon, L., & Urguhart. (2001). Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci. Int.* 122, 124-129.
- Hares, D. (2015). Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International:Genetics*, 17, 33-34.
- Hart, K., Kimura, S., Mushailov, V., Budimlija, Z., & Prinz, M. (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croat. Med. J.* 54, 248-256.
- Henrich , M., Felske-Zech, H., Brinkmann, B., & Hohooff, C. (2005). Characterisation of variant alleles in the STR systems D2S1338, D3S1358 and D19S433. *Int. J. Legal Med* 119, 310-313.
- Hershey, A., & Chase, M. (1952). Independent function of viral protein and nucleic acid growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*, 39-56.
- Herzog, U., Agustin, C., & Puschel, K. (2007). Allele frequencies of six miniSTR markers in a population sample from Northern German and its application on forensic stain analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 331-333.
- Higgins, D., & Austin, J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains. *Science and Justice*, 433-441.
- Hossain, T., Hassan, M., Mazumder, A., Momtaz, P., Sufian , A., Khandaker, J., & Akhteruzzaman , S. (2016). Genetic polymorphism studies on 22 autosomal STR loci of the PowerPlex Fusion System in Bangladeshi population. *Leg Med (Tokyo)*., 44-46.
- Jeffreys, A., Wilson, V., & Thein, S. (1985). Hypervariable Minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314-376.
- Jin, B., Qin, S., Haibo , L., Yingbi, L., Jin , W., Jing, Y., & Yiping, H. (2016). Mutational analysis of 33 autosomal short tandem repeat (STR) loci in southwest Chinese Han population based on trio parentage testing. *Forensic Science International: Genetics*, 86-90.
- Kang, L., Zhang, X., Liu, K., & Zhao, J. (2009). Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA HVR I and HVR II regions in the Deng populations from Tibet in China. 690-695. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953496>
- Kayser,M, & Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics,genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet*, 179-192.

- Kline, M., Hill, C., Decker, A., & Butler, J. (2011). STR sequence analysis for characterizing normal, variant, and null alleles. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5, 329-332.
- Klung, W., Cummings, M., Spencer, C., & Palladino, M. (2013). *Conceptos de genética*. Madrid: Pearson.
- Komski, L. (2014). *Wako* . Obtenido de 10 métodos de extracción de ADN: <http://www.wakolatinamerica.com/blog-reactivos/post/10-metodos-de-extraccion-de-adn/>
- Lareu, M., Barral, S., Salas, A., Pestoni, C., & Carracedo, A. (1998). Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D1S1656 locus. *Int J Legal Med.* , 244-247.
- Li, J., Luo, H., Song, F., Zhang, L., Deng, C., & Yu, Z. (2017). Validation of the Microreader™ 23sp ID system: A new STR 23-plex system for forensic application. *Forensic Sci Int Genet*, 67-73.
- Lisker, R., González, E., & Zentella Dehesa, A. (2013). *Introducción a la genética humana*. México: Manual Moderno.
- Lorente, M, Acosta, JA, & Villanueva, E. (1996). La tecnología del ADN en Medicina Forense: Importancia del indicio y del lugar de los hechos. *Cuadernos de Medicina Forense*.
- Maronas, O., Phillips, C., Sochting, J., Gomez-Tato, & Cruz, R. (2014). Development of a forensic skin colour predictive test. *Forensic Sci. Int. Genet.* 13C (2014), 34-44.
- Meissner, C., & Ritz-Timme, S. (2010). Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci. Int.* 203, 34-43.
- Mizuno, N. (2008). A D19S433 primer binding site mutation and the frequency in Japanese of the silent allele it causes. *J. Forensic Sci.* 53, 1068-1073.
- O'Connor, K., Hill, C., Vallone, P., J.M. Butle-, & J.M. Butle. (2011). Linkage disequilibrium analysis of D12S391 and vWA in U. S. population and paternity samples. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011), 538-540.
- Omelia, E., Uchimoto, M., & Williams, G. (2013). Quantitative PCR analysis of blood- and saliva-specific microRNA markers following solid-phase DNA extraction. *Analytical Biochemistry* , 120-122.
- Paz y Miño, C., & Lopez Cortes, A. (2014). *Genética Molecular y Citogenética Humana*. Yachay EP.
- Phillips, C., Fernandez-Formoso, I., Garcia-Magar, M., Porras, T., Tvedebrink, J., Amigo, J., . . . Gomez-Tato, A. (2011). Analysis of global variability in 15 established and

- 5 new European Standard Set (ESS) STRs using the CEPH human genome diversity panel. *Forensic Sci. Int, GENET* 5, 155-169.
- Piglionica, M., & Baldassarra, L. (2013). Allele frequencies of the new European Standard Set (ESS) loci in a population of Apulia (Southern Italy). *Forensic Science International: Genetics*, 7, e-35-e36.
- Pillai, R. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* , 1753-1756.
- Qasim , A., Haber, M., & Tyler-Smith, C. (2017). Evolutionary and Population Genetics in Forensic Science. En A. Amorin, & B. Budowle, *Handbook of Forensic Genetics* (págs. 33-60). London: world Scientific.
- Rangel-Villalobos, R., & Torres-Rodriguez . (1999 :105). Allele frequency distributions of six Amp-FLPS (D1S80, APO-B VWA, TH01, CSF1PO and HPRTB) in a Mexican population. *Forens Sci Int*, 125-129.
- Rodríguez González, N. (2014). *60 años del ADN*. Ciudad de México: Dirección General de Divulgación de la Ciencia:.
- Roewer, L., Kayser, M., Nagy, , M., Dieltjes, P., Bakker, E., & Krawczak, M. (1996). Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum Mol Genet*, 1029-1033.
- Ruiz, M. (2003). *Tesina para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. STR,s como marcadores genéticos de identificación forense*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ruiz, Y., Allwood, J., & Harbison, S. (2013). SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 444-452.
- Ruvkun , G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA. *Science* 294, 797-799.
- Salazar Montes, A., Sandoval Rodríguez, A., & Armendáriz Borunda , J. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Mc Graw Hill.
- Sauer, Eva, Babion, Iris, Madea, Burkhard, & Courts, Cornelius. (2014). PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification. *Forensic Science International: Genetics*, 217-223.
- Simpson, J. (1997). Molecular markers. . *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60, 73-76.
- Solano, A., Playán, A., López-Pérez, M., & Montoya, J. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud Publica Mex*, 151-161.

- Spichenok , O., Budimlija, Z., Mitchell , A., Jenny , A., & Kovacevic, L. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5, 452-478.
- Stoilivic, M. (1991). Detection of Semen and Blood Stains Using Polilight as a Light Source. *Forensic Sci. Int.*, 51-289.
- Sturm, R., Duffy, D., Zhao, Z., Leite, F., Stark, M., & Hayward, N. (2008). A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color. *Am. J. Hum. Genet.*, 424-431.
- Sulem, , P., Gudbjartsson, D., Stacey, S., & Helga, A. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat. Genet*, 39, 1443-1452.
- Tamay de Dios , L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real (Vol. 2)*. CDMX: Investigacion en discapacidad.
- Taylor, D., Brighth, J.-A., & Buckleton, J. (2016). *Biological Basis for DNA Evidence*. New York: Taylor & Francis Group.
- Tijo , J., & Levan, A. (1956). THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN. *Hereditas*,42, 1-6.
- Uchimoto, Mari L., Beasley, Emma, Coult, Natalie, Omelia, Emma J., World, Damian, & Williams, Graham. (2013). Considering the effect of stem-loop reverse transcription and real-time PCR analysis of blood and saliva specific microRNA markers upon mixed body fluid stains. *Forensic Science International: Genetics*, 418-421.
- Valenzuela, R., Henderson, M., Walsh, M., Garrison , N., Kelch , J., Cohen-Barak , O., . . . John Meaney, F. (2010). Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J. Forensic Sci.* 55, 315-322.
- Vullo, C. (2009). Frequency data for 12 mini STR loci in Argentina. *Forensic Science International: Genetics*, 484.
- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz, A., & Branicki, W. (2013). The HlrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA,. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7, 98-115.
- Wang , L., Zhao, X., Ye, J., Liu,, J., & Chen,, T. (2014). Construction of a library of cloned short tandem repeat (STR) alleles as universal templates for allelic ladder preparation. *Forensic Sci. Int. Genet* 12, 136-143.
- Watson, J., & Crick, F. (1953). A structure for DNA. *Nature*, 737-738.

- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., & Tinger, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *In: Nucleic Acids Res*, 6531-6535.
- Xueying , Z., Hui , L., Zheng , W., Ke , M., Yu, C., & Wenbin, L. (2016). Massively parallel sequencing of 10 autosomal STRs in Chinese using the ion torrent personal genome machine (PGM). *Forensic Science International: Genetics*, 34-38.
- Zanón-Moreno, V., & Pinazo-Durán. (26 de Aug de 2016). Obtenido de <http://www.oftalmo.com/seo/archivos/maquetas/B/11B2807D-75C7-7908-AB08-00004433082B/articulo.html>
- Zauza-Carrasco, M., Rosenfeld-Mann, F., & Estrada-Juarez, H. (2015). *Análisis de las variaciones en el número de repeticiones de 5 marcadores ancestrales en donadores recurrentes en México*. CDMX: Perinatología y reproducción humana.

Anexo I. Abreviaturas y Acrónimos.

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN_{mt}: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ARN: Ácido Ribonucleico

C: Citocina

CODIS: *Combined ADN Index System* o Sistema de Índices Combinados de ADN

FBI: Federal Bureau Investigation

G: Guanina

miARN: micro Ácido Ribonucleico

PCR: *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: quantitative polymerase chain reaction o Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SNP's: *Single nucleotide polymorphisms* o Polimorfismos de nucleótido simple

SNP's: *Single nucleotide polymorphisms* o Polimorfismos de un nucleótido,

STR: short tandem repeats o polimorfismos cortos repetidos en tandem

T: Timina

VNTR: Variable Number of *Tandem Repeats* o número variable de repeticiones en tándem

Anexo II. Glosario.

ADN: ácido desoxirribonucleico, es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos.

Alelo: Forma alterna de una secuencia o fragmento de ADN.

Amelogenina: Marcador que define en el perfil genético si el individuo es hombre (XY) o mujer (XX).

Biomarcador genético: Secuencia de ADN variable que presenta más de un alelo en la población, y que permite diferenciar el genoma materno del paterno en un individuo, como diferenciar individuos entre sí.

Biomarcador STR: *short tandem repeats*, cuya variabilidad se basa en el número de veces que se repite una secuencia corta, los alelos suelen definirse por el número de repeticiones.

Cariotipo: Es la colección de cromosomas de un individuo. El término también se refiere a una técnica de laboratorio que produce una imagen de los cromosomas de un individuo. El cariotipo es utilizado para buscar números o estructuras anormales de los cromosomas.

Ciclo Celular: comprende toda una serie de acontecimientos o etapas que tienen lugar en la célula durante su crecimiento y división.

Citoplasma: es la parte del protoplasma que, en una célula eucariota, se encuentra entre el núcleo celular y la membrana plasmática.¹² Consiste en una dispersión coloidal muy fina de aspecto granuloso, el citosol o hialoplasma, y en una diversidad de orgánulos celulares que desempeñan diferentes funciones.

CODIS, siglas de *Combined ADN Index System*, que es un conjunto de STRs sugerido para identificación humana, con el fin de crear bases de datos de perfiles genéticos que permitan intercambiar información de interés para la impartición de justicia, etc.

(crímenes violentos, crímenes contra la libertad sexual, identificación de militares, entre otros).

Cromátida: es cada una de las dos mitades de un cromosoma duplicado.

Cromosoma: Orgánulo en forma de filamento que se halla en el interior del núcleo de una célula eucariota y que contiene el material genético

Doble hélice. Es la descripción de la estructura de una molécula de ADN.

Electroforesis Capilar (EC): Método de electroforesis a través de un tubo del tamaño de un capilar relleno de polímero. Permite aplicar mayores voltajes, separar más rápido la molécula, y detectar la fluorescencia de ADN marcado con un fluoróforo de forma automática.

Electroforesis: Separación de una molécula en un medio de soporte por acción de un campo eléctrico, en base a su carga, peso molecular y forma.

Euromatina: Es una forma de la cromatina ligeramente compactada con una gran concentración de genes, y a menudo se encuentra en transcripción activa.

Fluorocromo: Molécula capaz de emitir fluorescencia después de un período de excitación

Gen: Fragmento de ADN con información para codificar una proteína. El gen es la unidad física básica de la herencia. Los genes se transmiten de los padres a la descendencia y contienen la información necesaria para precisar sus rasgos.

Genética: Se refiere al estudio de un gen en concreto.

Genómica: Se refiere al estudio del genoma completo de un organismo

Heterocigoto: Individuo que presenta un genotipo con un par de alelos diferentes para cierta secuencia de ADN (gen o marcador genético)

Heterocigoto: Individuo que presenta un genotipo con un par de alelos diferentes para cierta secuencia de ADN (gen o marcador genético)

Heterocromatina: Fracción de la cromatina que presenta alta condensación durante el ciclo de división celular

Homocigoto: Individuo que presenta un solo alelo en cierta secuencia de ADN (gen o marcador genético). Presumiblemente ambos padres le heredaron el mismo alelo

Intrón: Es una parte del gen que no codifica ningún aminoácido.

Kit: Conjunto de biomarcadores genéticos que pueden ser analizados simultáneamente, por ejemplo por PCR multiplex y electroforesis capilar

Loci: El plural de *locus*

Locus: Es el lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN

Mutación, Cambio en el material genético, en paternidad estas mutaciones se dan en los gametos (espermatozoides u óvulos) que darán origen a una falsa exclusión entre el padre biológico y el hijo.

PCR: siglas en inglés de “Reacción en cadena de la polimerasa”, técnica para replicar in vitro alguna secuencia de interés en el ADN, que genera millones de copias (amplifica) de ésta

Perfil de ADN: Conjunto de genotipos de un individuo para varios STRs

Primers: Pequeñas secuencias de nucleótidos usadas en la PCR para delimitar la región que se quiere amplificar; su extremo 3' es usado por la Taq polimerasa para añadir nucleótidos

Taq polimerasa: Enzima termoestable capaz de añadir nucleótidos al extremo de un primer para sintetizar una nueva cadena; fue extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*,