



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO DEL ADN EN LA IDENTIFICACION DE PERSONAS POSTMORTEM

T E S I S

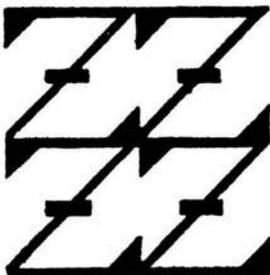
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA:

MARTHA JANETH CORTES CORTES

DIRECTOR DE TESINA:

M C. VALENTIN ISLAS PEREZ



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE

M. en C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ

VOCAL

Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA

SECRETARIO

M. en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ

SUPLENTE

Q.F.B. ROSALBA CERVANTES CRUZ

SUPLENTE

M. en C. ANGEL TLAPANCO OCHOA

A MIS PADRES

QUE HAN SABIDO GUIARME
POR EL BUEN CAMINO DE
LA VIDA, ASI COMO EL
GRAN APOYO RECIBIDO
EN LA CULMINACIÓN DE
UNO DE MIS GRANDES
ANHELOS.

**A MIS HIJAS Y ESPOSO
CON MUCHO CARIÑO**

ÍNDICE

I.	Resumen	7
II.	Introducción	8
III.	Marco Teórico.	9
1.	Diagnóstico Genético	11
2.	Partes del cuerpo que contienen ADN	12
3.	Precauciones durante el proceso de recogida y	
4.	envió de muestras al laboratorio	13
3.1.	Protección del personal	13
3.2.	Protección de las muestras	14
3.3.	Contaminación por material biológico humano	14
3.4.	Transferencia de indicios biológicos	14
3.5.	Contaminación microbiológica	15
3.6.	Contaminación química	15
4.	Documentación en casos de interés criminal	17
4.1.	Documentación necesaria	17
4.2.	Identificación de las muestras	18
4.2.1.	Listado de las muestras de referencia	18
4.2.2.	Listado de indicios biológicos	18
4.3.	Cadena de custodia	18
4.4.	Documentación recomendable	19

5.	Toma de muestras de referencia en personas y cadáveres	19
5.1.	Muestras evidentes en personas vivas	19
5.1.1.	Sangre	20
5.1.2.	Células epiteliales bucales	20
5.1.3.	Pelos con raíz	21
5.2.	Muestras evidentes en personas transfundidas	21
5.3.	Muestras evidentes en cadáveres en buen estado de conservación	21
5.3.1.	Sangre postmortem	21
5.3.2.	Músculo esquelético	22
5.4.	Muestras evidentes en cadáveres carbonizados	22
5.4.	Muestras evidentes en cadáveres en avanzado estado de putrefacción o esqueletizado	23
5.5.1.	Huesos	23
5.5.2.	Dientes	23
5.6.	Muestras evidentes en cadáveres embalsamados	23
5.7.	Otras muestras de referencia de personas fallecidas	24
5.7.1.	Restos biológicos del fallecido existentes en centros hospitalarios.	24
5.7.2.	Análisis de restos biológicos del fallecido que aun permanezcan en el ámbito familiar.	24

6.	Recogida de indicios biológicos en el lugar de los hechos	25
6.1.	Manchas secas en muestras pequeñas y de fácil Transporte	25
6.2.	Manchas secas en muestras grandes no transportables.	26
6.3.	Indicios húmedos	26
6.4.	Indicios líquidos	27
6.4.1.	Sangre	27
6.4.2.	Semen	27
6.4.3.	Líquido amniótico	27
6.4.4.	Orina u otros fluidos	28
6.5.	Pelos dudosos	28
6.6.	Restos cadavéricos	28
6.6.1.	Restos cadavéricos en buen estado de conservación	28
6.6.2.	Restos cadavéricos carbonizados	29
6.6.3.	Restos cadavéricos en avanzado estado de putrefacción o esqueletizados.	29
6.6.4.	Restos fetales y placentarios	30
7.	Recogida de indicios biológicos en el cuerpo de la víctima	30
7.1.	Manchas de sangre, semen	30
7.2.	Saliva en marcas de mordedura	30

7.3.	Uñas	30
7.4.	Pelos dudosos	31
8.	Agresiones Sexuales	31
8.1.	Documentación requerida	31
8.2.	Recogida de indicios biológicos	32
8.3.	Recogida de muestras evidentes	33
9.	Recogida de muestras en caso de investigación biológica de paternidad	33
10.	Sistema de empaquetamiento y preservación de muestras	34
10.1.	Identificación de las muestras	34
10.2.	Cadena de custodia	34
10.3.	Sistema de empaquetado	35
10.3.1.	Tubos con indicios líquidos	35
10.3.2.	Frascos o recipientes con indicios líquidos, o con órganos, tejido, etc.	35
10.3.3.	Hisopos estériles en seco	35
10.3.4.	Muestras con manchas secas	36
10.3.5.	Pelos dudosos	36
10.3.6.	Costras, raspaduras	36
10.3.7.	Huesos, dientes	37

IV.	Métodos de análisis e identificación	
	genética	38
1.	Extracción del ADN	38
2.	Amplificación genética	39
2.1.	RFLP	39
2.2.	PCR	41
3.	Tipificación	42
V.	Problema planteado	44
VI.	Objetivos	45
VII.	Importancia del estudio	46
VIII.	Interpretación de los resultados	
	de la prueba de ADN	47
IX.	Conclusiones	48
X.	Referencias bibliográficas	49

I. RESUMEN

La molécula fundamental para la composición genética de cada individuo es el ácido desoxirribonucleico (ADN), este es diferente para cada persona, salvo en los gemelos idénticos. Dentro del campo forense existen diversos delitos en donde hay transferencia de indicios entre víctima y victimario además de el lugar de los hechos que generalmente hay sangre, semen, saliva, cabellos o tejidos. Es por ello que se utilizan métodos de análisis e identificación genética, los cuales requieren de infraestructura y equipo especial para su realización y que en la mayoría de laboratorios forenses en México no poseen.

El presente proyecto es un estudio documental, el cual concentra la información respecto a la identificación de personas postmortem mediante el estudio de ADN, ya que las referencias respecto a este tema se encuentran dispersas y poco accesibles.

Se debe tener en cuenta que para poder impartir justicia se requiere de precisión y exactitud en las pruebas periciales relacionadas con la identificación de cadáveres y personas vivas y es en este campo donde la genética forense juega un papel muy importante

II. INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco tiempo, los procedimientos para efectuar un diagnóstico genético eran bastante burdos en la actualidad este diagnóstico se basa en el análisis directo del ADN, el cual no sólo es útil en lo que respecta a enfermedades hereditarias o a cáncer, sino que con este análisis es posible determinar, con absoluta precisión, de quien provino una muestra de ADN contenida en apenas unas gotas de sangre, semen...etc. (1)

Dentro de los métodos de análisis e identificación genética encontramos el RFLP (Fragmentos de restricción de longitud polimorfica) y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

En la actualidad los órganos de justicia requieren de mayor precisión y exactitud en las pruebas periciales relacionadas con la identificación de cadáveres y personas vivas, y la genética forense es una potente herramienta para tal fin.

Es una necesidad urgente que las instituciones procuradoras de justicia del país cuenten con laboratorios de genética forense diseñados y equipados adecuadamente con personal capacitado al más alto nivel para realizar investigaciones y pruebas con aplicación en el campo forense.

Esta tesina se realiza para facilitar a los interesados en esta ciencia la búsqueda de metodologías pues para el tema propuesto las referencias se encuentran muy dispersas e incompletas.

III. MARCO TEÓRICO

La genética estudia la forma como las características de los organismos vivos, sean estas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o conductuales, se transmiten, se generan y se expresan, de una generación a otra, bajo diferentes condiciones ambientales. La genética pues intenta explicar como se heredan y se modifican las características de los seres vivos, que pueden ser de forma, fisiológicas e incluso de comportamiento. De esta forma la genética trata de estudiar cómo estas características pasan de padres a hijos, a nietos, etc., y por qué, a su vez, varían generación tras generación.

Esta ciencia se ha desarrollado de manera vertiginosa durante el siglo XX, aunque tiene sus raíces en el siglo XIX, época en que los científicos intentaban contestar las cuestiones relativas a la variación y la herencia. Antes de que la genética existiera como ciencia, principalmente durante la segunda mitad del siglo XIX, la herencia se estudiaba a partir de lo que se llama la hibridización o cruce de organismos entre si para analizar su descendencia.

La clave para resolver uno de los grandes misterios de la vida, el secreto de la herencia biológica, sería descubierta en el año de 1953 por dos científicos de la Universidad de Cambridge. A partir de indicios obtenidos de fuentes extraordinariamente diversas, estos investigadores lograron finalmente ensamblar la singular estructura molecular de ADN (ácido desoxirribonucleico), base fundamental de la herencia. Su hoy conocido modelo de doble hélice (espiral) abrió el camino de las investigaciones del código genético, complejo sistema químico por medio del cual el ADN controla y dirige el proceso de la síntesis proteínica. En 1962, estos dos científicos James Watson, bioquímico estadounidense y Francis Crick, biólogo inglés, compartieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina.

La labor de Watson y Crick sería la culminación de largos años de exploración científica sobre la naturaleza de la herencia biológica. La senda que habría de conducir al descubrimiento de la doble hélice comenzó en un apartado monasterio casi 100 años antes. Fue allí donde el fraile agustino y el científico austriaco Gregor Mendel, el padre de la genética se sirvió por vez primera de las matemáticas y de pruebas sistemáticas para explicar la razón por la que determinadas características

se transmiten del progenitor a su descendencia. La información genética esta contenida en la estructura molecular de ácido desoxirribonucleico, esta es una molécula muy larga como una hebra ó cadena, formada de la unión de unos cuantos componentes, que se repiten millones de veces con una estricta periodicidad. La información genética esta cifrada en el orden en el que uno de estos componentes esta acomodado a lo largo de la cadena. En realidad una molécula de DNA esta formada por dos de estas cadenas entrelazadas en forma de una doble hélice, cada una siendo una imagen en el espejo de la otra. El componente que le confiere su propiedad informativa al DNA, se podría describir como una protuberancia lateral de una de las cadenas, que se encuentra acoplado a un componente similar de la otra cadena, de acuerdo a reglas estrictas, lo que los hace parecer peldaños de una escalera de caracol, que seria la doble hélice. Dado que los componentes que forman esa especie de escalones no son iguales entre si, en la secuencia que adoptan a lo largo de la cadenas moleculares esta contenida la información genética. Podemos comparar el genoma humano con un texto escrito con un alfabeto de solo cuatro letras, a las que corresponden estas protuberancias que forman parte de los componentes que técnicamente llamamos bases nitrogenadas: adenina, citosina, tiamina, guanina y así con cuatro letras (A, C, T y G) se ha podido escribir todos los textos biológicos, desde el de un virus, un majestuoso pino, uno de dinosaurios que habitaron hace más de 65 millones de años o el ser humano. Las razones por las que cada individuo es genéticamente diferente de todos los demás (excepto si tiene un gemelo idéntico) residen por un lado en la gran variedad de formas que puede tener cada uno de los aproximadamente 100,000 genes que tenemos los seres humanos y, por otro, en la forma sexual como nos reproducimos. Veamos la primera razón. Cada gen contiene las especificaciones de una estructura o de una función particular del cuerpo, pero el detalle de estas especificaciones puede variar. Las diferentes formas de un mismo gen las denominamos alelos y pueden darse dentro de lo que consideraríamos como una variación normal, por ejemplo los distintos grados de pigmentación de la piel, o variedades fuera de lo normal, como en el caso de los albinos. Se sabe que la variación genética dentro de una especie, en particular la nuestra, es verdaderamente enorme. Lo podemos percibir a simple vista y se ha documentado al encontrar muchísimas diferencias en el DNA de distintos individuos. Más adelante nos referiremos al desarrollo de procedimientos para detectar estas diferencias en alguna persona en particular, que es la esencia del diagnóstico genético. (2-5)

1. DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Hasta hace poco tiempo los procedimientos para efectuar un diagnóstico genético eran bastante burdos, apenas en 1956 se descubrió que el número normal de cromosomas en cada célula es 46; este avance fue consecuencia de una metodología más depurada e hizo a su vez posible descubrir en 1959 que el tener un cromosoma de más (el número 21) era la causa del síndrome de Down. En 1960 se desarrolló otra clase de diagnóstico genético con implicaciones muy diferentes. Bob Guthrie de la Universidad de New York del Estado de Buffalo, sublimó el dolor de tener un hijo con retraso mental, en una verdadera cruzada para que a todos los niños recién nacidos en los E. U. se les aplicase el análisis de sangre que él había descubierto y que permite identificar a aquellos con una enfermedad hereditaria del metabolismo, la fenilcetonuria, a tiempo para darles un tratamiento que les evita el retraso mental al que una mutación genética los había destinado (6-7).

El estudio del ADN nos ha colocado en el umbral de una nueva era que traerá tantos cambios, que rebasaran con mucho los límites de la medicina y de la biología. El diagnóstico genético nos puede llevar a tratar a un recién nacido y ayudarlo a que crezca como un humano normal en vez de cómo un deficiente mental. Nos puede permitir descubrir una alta predisposición a padecer diabetes y tomar medidas para reducir esta probabilidad, o cáncer y estar alerta para descubrirlo en su etapa inicial. Pero en otros casos el diagnóstico traerá la sentencia inapelable de que dentro de dos, tres o cinco décadas padeceremos una enfermedad devastadora e incurable, sin que nada podamos hacer para evitarla. En el caso de diagnóstico prenatal el dilema es si abortar o no a un feto. Las cosas empezaron a cambiar hará unos 15 años, al irse desarrollando novedosas herramientas metodológicas que están haciendo posible estudiar directamente el DNA. Por ejemplo, es posible cortarlo con gran precisión en lugares específicos gracias a unas enzimas llamadas endonucleasas de restricción, separar los fragmentos así cortados por medio de electroforesis e identificarlos con sondas moleculares gracias a las reglas de complementariedad de las bases nitrogenadas. Más recientemente se ha desarrollado un procedimiento (la reacción en cadena de la polimerasa) que permite amplificar billones de veces en unas pocas horas cualquier gen en el que se este interesado y así poderlo estudiar con gran facilidad. Actualmente se puede identificar con exquisita precisión a los portadores de mutaciones responsables de más de un millar de enfermedades hereditarias y de tumores malignos. El nuevo diagnóstico genético basado en el análisis directo del DNA no solo será

útil para enfermedades hereditarias o cáncer. Es ya posible el determinar, con gran precisión, de quien provino una muestra de DNA contenida en apenas unas gotas de sangre, semen o, en teoría, ¡incluso de un solo cabello! (8-9)

El ADN se analiza en los fluidos del cuerpo, las manchas, y otros tejidos biológicos recuperados como evidencia. Se comparan los resultados de análisis de ADN de muestras biológicas con los resultados de análisis de ADN de muestras conocidas. Este análisis puede asociar a la víctima(s) y/o sospechoso(s) entre sí o con una escena del crimen (10).

Un asesinato fue resuelto cuando el ADN del sospechoso, tomado de la saliva en un molde de impresión dental, fue el mismo ADN de la muestra obtenida de una marca de una mordida en la víctima. Un violador enmascarado se declaró culpable cuando el ADN encontrado en la víctima fue el mismo ADN que se obtuvo al limpiar el pene del sospechoso 6 horas después del ataque. Numerosos casos han sido resueltos por el análisis de ADN de saliva encontrada en cigarrillos, estampillas y el área alrededor de la boca en las mascarillas de esquí. El análisis de ADN de un solo pelo encontrado en la garganta de la víctima fue la evidencia usada para el esclarecimiento de un asesinato (6,11).

Los avances tecnológicos en las ciencias forenses han hecho del uso del ADN una herramienta de gran ayuda en la resolución de casos que parecían perdidos o cerrados por falta de evidencias es por ello que se han realizados grandes avances en este campo para poder en un futuro inmediato automatizar todos estos análisis y así poder tener resultados mas rápidos y precisos (12-14).

2. PARTES DEL CUERPO QUE CONTIENEN ADN

El ADN se encuentra en: sangre, semen, células superficiales, tejidos, órganos, m úsculo, células del cerebro, hueso, dientes, pelo, saliva, mucosidad, transpiración, uñas, orina, excremento, etc.(15).

3. PRECAUCIONES DURANTE EL PROCESO DE RECOGIDA Y ENVIO DE MUESTRAS AL LABORATORIO

Quando se lleva a cabo la recogida de muestras, tanto dudosas como de referencia, debe mantener una serie de precauciones encaminadas a proteger tanto al personal que realiza dicha recogida como a la propia muestra, que como veremos también puede verse afectada, si el proceso no se lleva a cabo con las suficientes garantías (6).

3.1. PROTECCIÓN DEL PERSONAL

Siempre que se manipula material biológico humano es prudente asumir que este tipo de material puede contener patógenos potencialmente peligrosos y por tanto ser una posible fuente de infección (VIH, hepatitis, tuberculosis, meningitis...etc.). Por ello es necesario mantener una serie de precauciones universales como las que a continuación se detallan:

- Prevenir, en todo momento, el contacto directo del operario con la muestra mediante el uso de guantes, mascarilla, bata u otro tipo de ropa protectora.
- Prohibir el consumo de comidas y bebidas, así como de tabaco.
- Extremar las condiciones de asepsia y siempre que sea posible utilizar material desechable. Una vez terminada la recogida de muestras, tirar todo el material desechable utilizado en contenedores para residuos biológicos infecciosos, para eliminarlos posteriormente según las normas de destrucción de residuos biológicos.
- Recomendar la vacunación del personal que esta en contacto con este tipo de muestras.
- Cuando la recogida de muestras se realiza en la sala de autopsias, estas precauciones deben extremarse al máximo para evitar contaminaciones (16-17).

3.2 PROTECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Son numerosos los procesos que pueden afectar a la integridad de una muestra y por tanto a la posible obtención de perfiles genéticos a partir de los vestigios biológicos existentes en ella. Estos procesos, que en algunos casos son inherentes a la muestra, en otros pueden producirse o incrementarse cuando la recogida y envío de las muestras al laboratorio se lleva a cabo de una forma defectuosa. Estos procesos son:

3.3 CONTAMINACIÓN POR MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO

Esta contaminación se debe al depósito de material biológico humano, en el lugar de los hechos y/o en el cuerpo de la víctima, con posterioridad a la producción del delito. Puede estar causada por personas ajenas a la investigación como curiosos o familiares, o por personas que colaboran en la investigación y que de forma accidental o desconocimiento, producen la contaminación. La contaminación es frecuente durante el proceso de recogida de indicios si no se mantiene las precauciones mínimas y también por defectos en el empaquetado de las muestras.

3.4 TRANSFERENCIA DE INDICIOS BIOLÓGICOS

Esta transferencia se debe al traslado, normalmente accidental, de los indicios de una localización a otra, lo que puede dar lugar a una contaminación o puede ocasionar la pérdida de una prueba, Los vestigios biológicos que sufren con más facilidad este cambio de localización son los pelos (18).

3.5 CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA

Este tipo de contaminación tiene lugar por el desarrollo de microorganismos y suele estar favorecida por la humedad y las altas temperaturas. Normalmente se produce o incrementa por defectos en el empaquetado y conservación de las muestras hasta su envío al laboratorio (18).

3.6 CONTAMINACIÓN QUÍMICA

Esta contaminación se debe a la presencia de productos químicos que van a dificultar algunos de los procesos del análisis genético, fundamentalmente la amplificación y extracción de ADN. Se produce fundamentalmente cuando las muestras se envían inmersas en productos conservadores como el formol o cuando se realizan estudios previos con sustancias químicas (estudio de huellas dactilares) que pueden comprometer el análisis del ADN.

Los procesos descritos podrían evitarse o minimizarse si se mantienen precauciones básicas como son:

- Aislar y proteger, lo más rápidamente posible, la escena del delito y salvo que alguna circunstancia lo impida, los indicios biológicos deben ser los primeros en ser recogidos.
- Usar guantes limpios que deben cambiarse con frecuencia, especialmente cuando se manipulan indicios biológicos susceptibles de tener distinto origen.
- Evitar hablar o estornudar sobre las muestras. Usar mascarilla.

- Usar bata u otro tipo de ropa protectora.
- Utilizar instrumental desechable (de un solo uso) siempre de preferencia.
- No añadir conservadores a las muestras.
- Dejar las muestras secar a temperatura ambiente, en un lugar protegido, antes de empaquetarlas para su envío definitivo al laboratorio.
- Empaquetar cada muestra por separado.
- Siempre que sea posible empaquetar las muestras en bolsas de papel o cajas de cartón evitando utilizar plástico, por que favorece la descomposición de las muestras orgánicas.
- Una vez terminada la recolección de muestras, tirar todo el material desechable utilizado (guantes, pipetas, papeles, etc....) en bolsas de basura o contenedores para residuos biológicos, para eliminarlo posteriormente según las normas de destrucción de residuos biológicos.

4. DOCUMENTACIÓN EN CASOS DE INTERES CRIMINAL

4.1. DOCUMENTACIÓN NECESARIA

➤ FORMULARIO DE ENVIO DE MUESTRAS (19).

Este formulario debe constar de:

- La investigación solicitada (Investigación de restos de sangre, investigación de restos de semen, identificación de restos cadavéricos)
- Antecedentes y datos de interés sobre el caso como:
- Causa de los hechos
- Lugar de los hechos
- Fecha de los hechos
- Instrumento utilizado en la agresión
- Si hay cadáver: antigüedad, conservación...etc.
- Datos de la víctima, como:
- Edad
- Sexo
- Grupo poblacional
- Causa de la muerte o existencia de lesiones
- Relación con el sospechoso
- Datos del sospechoso, como:
- Edad
- Sexo
- Grupo poblacional
- Existencia de lesiones, traumatismos, heridas, etc.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

En todos los formularios debe aparecer un listado donde se identifiquen y describan brevemente las muestras (19).

4.2.1. LISTADO DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA DONDE DEBE ESPECIFICARSE:

- Número de referencia de la muestra
- Tipo de muestra (sangre, saliva, pelos, etc...). Si la muestra elegida es sangre líquida describir el tipo de anticoagulante utilizado en el envío.
- Nombre de la persona a la que se le realiza la toma o código elegido para identificarla.
- Relación con el caso (víctima, sospechoso, etc....) (19).

4.2.2. LISTADO DE LOS INDICIOS BIOLÓGICOS DONDE DEBE ESPECIFICARSE:

- Número de referencia de la muestra
- Tipo de muestra con una descripción breve (p. e., toma vaginal, camisa azul, cuchillo con mango de madera, etc....)
- A quien pertenece (víctima, sospechoso) y donde se ha localizado (p. e., coche, garaje, cuerpo víctima, etc...)
- Tipo de indicio en concreto que debe estudiarse (semen, sangre, saliva, etc...) (19).

4.3. CADENA DE CUSTODIA

En todos los formularios debe aparecer un apartado dedicado a la cadena de custodia donde debe constar: (19).

Nombre o identificación y firma de la/s persona/s responsable/s de la recogida de muestras

- Fecha y hora de la recogida
- Condiciones de almacenaje de las muestras hasta su envío al laboratorio.

4.4. DOCUMENTACIÓN RECOMENDABLE (6).

- Informe preliminar de autopsia
- Informe clínico en casos de muestras tales como tumores...etc.
- Informe o datos de la inspección ocular
- Documentación adicional sobre la localización de las muestras o indicios biológicos en el lugar de los hechos o en el cuerpo de la víctima, mediante esquemas, dibujos, videos....etc.
- Fotografías de indicios biológicos, que deben ser realizadas antes de ser recogidas del lugar de los hechos o del cuerpo de la víctima

5. TOMA DE MUESTRAS DE REFERENCIA EN PERSONAS Y CADAVERES

La toma de muestras de referencia en personas vivas debe hacerse con autorización judicial y tras el consentimiento informado de la persona a la cual se le realiza la toma, debiendo existir un documento firmado con la autorización expresa de qué se cede la muestra para la realización de análisis genéticos a efectos exclusivamente identificativos (20).

5.1. MUESTRAS EVIDENTES EN PERSONAS VIVAS

En personas podemos obtener muestras evidentes como las que a continuación se mencionan:

5.1.1. SANGRE

Es la muestra dudosa clásica utilizada para la obtención de ADN, y se puede obtener por:

- **Punción venosa.** Muestra de unos 5 mL. de sangre que deben introducirse en un tubo que contenga un anticoagulante tipo EDTA.

Si se requiere sangre para la realización de otro tipo de análisis (toxicológico, serológico...) deberán recogerse muestras adicionales de sangre.

- **Punción dactilar.** Con una aguja o lanceta quirúrgica se pincha la cara anterior de algún dedo de la mano y las gotas de sangre se depositan sobre un papel secante. Lo normal es depositar 3-4 gotas de sangre y dejarlas secar a temperatura ambiente en un lugar protegido.

En la actualidad existen kits estandarizados para este tipo de tomas (21).

5.1.2. CÉLULAS EPITELIALES BUCALES (SALIVA)

Obtenidas frotando la parte interna de los carrillos con hisopos estériles en seco. Se realizan dos tomas: Con un hisopo se frota la cara interna del carrillo derecho y con el otro, la cara interna del carrillo izquierdo. Los hisopos correctamente identificados, deben dejarse secar a temperatura ambiente en un lugar protegido. Es fundamental no introducirlos en las fundas hasta que no estén totalmente secos, ya que en la saliva hay bacterias que proliferan rápidamente con la humedad, produciendo la degradación del ADN.

También pueden utilizarse cepillos cónicos o hisopos tipo cepillo para tomas endocervicales que son apropiados para este tipo de tomas y secan con gran facilidad.

Es conveniente que las tomas se realicen al menos una hora después de que la persona haya comido, para evitar la presencia de restos

alimenticios o bien que se realicen enjuagues bucales abundantes previos a la toma.

En la actualidad existen kits estandarizados para este tipo de tomas (22).

5.1.3. PELOS CON RAIZ

De 10 – 15 cabellos arrancados con raíz.

5.2. MUESTRAS EVIDENTES EN PERSONAS TRANSFUNDIDAS

Si una persona ha recibido una transfusión de sangre, es conveniente utilizar como muestra de referencia una toma de saliva o pelos con raíz, ya que en la sangre se podría detectar la presencia de ADN constitucional en mezcla con el procedente del material transfundido, al menos en un corto periodo de tiempo posterior a la transfusión (22).

5.3. MUESTRAS EVIDENTES EN CADAVERES EN BUEN ESTADO DE CONSERVACIÓN

En un cadáver que se encuentre bien conservado se pueden obtener muestras de:

5.3.1. SANGRE POSTMORTEM

Se recoge una muestra de unos 10 mL de sangre que debe introducirse en un tubo que contenga un anticoagulante tipo EDTA.

Si se requiere sangre para la realización de otro tipo de análisis deberán recogerse muestras adicionales (22).

5.3.2. MÚSCULO ESQUELÉTICO

Se seleccionan dos fragmentos de músculo esquelético de la zona mejor conservada, de unos 10 g de peso (aproximadamente de 2 cm. de lado) que se introducen en un recipiente de plástico con boca ancha y tapón de rosca.

Se elige este tipo de tejido por ser, junto con el músculo cardiaco, el más resistente a la putrefacción.

Si existen dudas sobre la conservación del cadáver, conviene extraer 4 piezas dentales, si es posible molares, y reservarlas, para evitar la posible exhumación del cadáver (22).

5.4. MUESTRAS EVIDENTES EN CADAVERES CARBONIZADOS

A pesar de lo que la apariencia externa pueda indicar, la estabilidad del ADN a altas temperaturas permite que, en cadáveres en los que la carbonización no es total, el análisis genético se puede llevar a cabo a partir de fragmentos de músculo esquelético de zonas profundas y de la sangre semisólida que permanece en el interior de las cavidades cardíacas.

Si la carbonización es total, lo recomendable es ponerse en contacto con el Laboratorio para valorar, en función de las muestras disponibles y de su estado, cuales son las más adecuadas para el análisis (21).

5.5. MUESTRAS EVIDENTES EN CADAVERES EN AVANZADO ESTADO DE PUTREFACCIÓN O ESQUELETIZADOS

En cadáveres en un estado avanzado de putrefacción o esqueletizados podemos obtener muestras de:

5.5.1. HUESOS

Se limpiarán los restos de putrilago y siempre que sea posible se seleccionará un hueso largo, preferiblemente un fémur. Si no es posible disponer de esta muestra, lo recomendable es ponerse en contacto con el Laboratorio para valorar, en función de las muestras disponibles y de su estado, cuáles son las más adecuadas para el análisis (19).

5.5.2. DIENTES

Se seleccionan al menos 4 piezas dentales, si es posible molares, que no estén externamente dañados, ni hayan sido sometidos a endodoncias (24).

5.6. MUESTRAS EVIDENTES EN CADÁVERES EMBALSAMADOS

En cadáveres embalsamados (cadáveres conservados artificialmente mediante la utilización de líquidos conservadores tipo formol) el ADN sufre procesos de degradación que hacen, en la mayor parte de los casos, muy difícil el análisis. Para seleccionar las muestras más adecuadas, lo recomendable es, ponerse en contacto con el Laboratorio y en función de la técnica de embalsamamiento, antigüedad...etc., valorar que muestras son más idóneas para el análisis (21).

5.7. OTRAS MUESTRAS DE REFERENCIA DE PERSONAS FALLECIDAS

En aquellos casos en los que no se puede exhumar un cadáver para la obtención de muestras dudosas o en los casos en los que se solicita una identificación de restos cadavéricos y no hay familiares vivos disponibles para realizar esta investigación, podemos utilizar otras estrategias como son:

5.7.1. EL ANÁLISIS DE RESTOS BIOLÓGICOS DEL FALLECIDO EXISTENTES EN CENTROS HOSPITALARIOS

Es posible analizar muestras de sangre, biopsias incluidas en parafina, preparaciones histológicas...etc., del fallecido que puedan conservarse en hospitales. No es recomendable el análisis de tejidos fijados en formol, ya que este compuesto modifica el ADN, dificultando cuando no imposibilitando la obtención de resultados.

5.7.2. EL ANÁLISIS DE RESTOS BIOLÓGICOS DEL FALLECIDO QUE AUN PERMANEZCAN EN EL AMBITO FAMILIAR

Es posible analizar muestras que contengan restos biológicos del fallecido, tales como sobres escritos que pueden contener restos de saliva en la solapa y en el sello, maquinillas de afeitarse, peines, cepillos...etc.

Este tipo de muestras en muchos casos deben ser autenticadas mediante análisis genético de familiares, ya que suelen ser aportadas por la familia que en algunos casos puede ser parte interesada en el proceso judicial.

6. RECOGIDA DE INDICIOS BIOLÓGICOS EN EL LUGAR DE LOS HECHOS

En el lugar de los hechos podemos encontrar diferentes indicios biológicos como son:

6.1. MANCHAS SECAS EN MUESTRAS PEQUEÑAS Y DE FACIL TRANSPORTE

En general este tipo de muestras serán recogidas e introducidas por separado en bolsas de papel o cajas de cartón (19).

A continuación vamos a describir algunas de las muestras más frecuentes:

- **Colillas:** Deben recogerse con pinzas limpias e introducirse por separado en bolsas de papel o cajas de cartón pequeñas.
- **Chicles:** Deben recogerse con pinzas limpias e introducirse por separado en envases de plástico duro.
- **Sobres y sellos:** Sin despegarse, se recogen con unas pinzas limpias y se introducen en bolsas de papel o plástico.
- **Armas blancas:** Se deben recoger con mucho cuidado para no afectar al estudio de huellas dactilares. Colocarlas por separado en cajas de cartón, preparadas especialmente para este tipo de muestras, de tal manera que queden bien sujetas. Si no se cuenta con este tipo de cajas, se debe proteger la hoja del arma e introducir por separado en bolsas de papel.
- **Llaves, monedas, joyas...etc.:** Se recogen con unas pinzas limpias y se introducen por separado en bolsa de papel.
- **Piedras, ramas, hojas...etc.:** Se recogen e introducen por separado en bolsas de papel...
- **Billetes, papeles, cartones pequeños...etc.:** Se recogen e introducen por separado en bolsas de papel.

6.2. MANCHAS SECAS EN MUESTRAS GRANDES NO TRANSPORTABLES

La recogida de este tipo de manchas va a depender fundamentalmente del soporte sobre el que asienta la mancha:

Soportes no absorbentes (p. e. cristales, metales...etc.). En estos casos los indicios pueden recogerse de dos maneras:

- Frotando con un hisopo estéril ligeramente mojado con agua destilada.
- Raspando la mancha con un bisturí sobre un papel, que debe ser cuidadosamente doblado e introducido en una bolsa de papel.
- Soportes absorbentes (p. e. telas, tapicerías, alfombras...etc.). En estos casos lo más adecuado es recortar la mancha con un bisturí o unas tijeras e introducirla en una bolsa de papel (19).

6.3. INDICIOS HÚMEDOS

• ROPAS U OTROS OBJETOS CON INDICIOS HÚMEDOS

Las ropas de vestir son las muestras que de forma más frecuente pueden contener indicios húmedos, generalmente manchas de sangre. No obstante puede haber otras muestras como las ropas de cama, toallas, cortinas, tapicerías de coche...etc. En estos casos, las muestras completas o las manchas objeto de estudio deben introducirse en bolsas de plástico y trasladarse del lugar de los hechos a las instalaciones del personal que lleva a cabo la recogida donde se dejarán secar en un lugar protegido, sobre una superficie limpia. Las muestras completas o las manchas, una vez secas, se envuelven por separado en papel y se introducen en bolsas de papel independientes (19).

6.4. INDICIOS LÍQUIDOS

En el lugar de los hechos se pueden encontrar indicios líquidos como son:

6.4.1. SANGRE

- Sangre en gran cantidad. Se debe recoger con una pipeta de plástico desechable e introducir en un tubo que contenga un anticoagulante tipo EDTA.
- Sangre coagulada. Se debe recoger con una cucharilla de plástico e introducir en un tubo o frasco de plástico.
- Sangre en escasa cantidad. Se debe recoger con un hisopo estéril (19).

6.4.2. SEMEN

- Los preservativos con semen líquido se colectan, se atan bien para que no se derrame el contenido y se introducen en un frasco de plástico.
- Semen en escasa cantidad. Se debe recoger con un hisopo estéril (23).

6.4.3. LÍQUIDO AMNIÓTICO

- Se recoge una muestra de unos 10 mL que se introduce en un tubo.

6.4.4. ORINA U OTROS FLUIDOS BIOLÓGICOS

- Deben recogerse con una pipeta de plástico desechable e introducirse en tubos o frascos (19).

6.5 PELOS DUDOSOS

Los pelos dudosos deben ser recogidos con unas pinzas limpias, colocando cada pelo o cada grupo de pelos en un papel pequeño que debe ser doblado con cuidado e introducido en una bolsa de papel pequeña (19).

6.6 RESTOS CADAVERÍCOS

La recogida de restos cadavéricos va a estar condicionada, evidentemente, por el tipo de restos que aparezcan en el lugar de los hechos. En general lo más frecuente es encontrar:

6.6.1. Restos cadavéricos en buen estado de conservación.

- Siempre que sea posible es recomendable seleccionar fragmentos de tejido muscular de las zonas mejor conservadas que se introducirán en recipientes de plástico con boca ancha y tapón de rosca y sobre todo sin líquido conservador.
- Si únicamente existiesen vísceras, se elegirán las que estén mejor conservadas, teniendo en cuenta que el corazón es uno de los órganos que mejor resiste los procesos de putrefacción.
- Si se sospecha la existencia de restos cadavéricos de varios individuos, es fundamental enviar cada una de las muestras por separado (21).

6.6.2. Restos cadavéricos carbonizados.

- A pesar de lo que la apariencia externa pueda indicar, en restos cadavéricos en los que la carbonización no es total, el análisis genético se puede llevar a cabo a partir de fragmentos de músculo esquelético de las zonas menos afectadas.
- Si la carbonización fuese total, es recomendable ponerse en contacto con el Laboratorio para valorar, en función de las muestras disponibles y de su estado, cuales son las más adecuadas para su análisis.
- Si se sospecha la existencia de restos cadavéricos de varios individuos distintos, es fundamental enviar cada una de las muestras por separado, introduciéndolas en frascos o recipientes de boca ancha y tapón de rosca y sobre todo, sin líquido conservador (21).

6.6.3. Restos cadavéricos en avanzado estado de putrefacción o esqueletizados.

- En estos casos es recomendable seleccionar huesos (siempre que sea posible un hueso largo tipo fémur) y dientes (al menos 4 piezas dentales) que se introducirán por separado en bolsas de papel, mas o menos grandes dependiendo del tamaño de las muestras.
- Si los huesos tienen restos de putrilago, se limpiarán lo mejor posible y se introducirán en recipientes adecuados a su tamaño.
- Si se sospecha la existencia de restos cadavéricos de varios individuos distintos, es fundamental enviar cada una de las muestras por separado (21).

6.6.4. RESTOS FETALES Y PLACENTARIOS

- Se recogen con unas pinzas y se colocan por separado en frascos de boca ancha y tapón de rosca, y sobre todo sin líquido conservador.

7. RECOGIDA DE INDICIOS BIOLÓGICOS EN EL CUERPO DE LA VICTIMA.

7.1. Manchas de sangre, semen u otros fluidos biológicos.

Recoger la mancha con un hisopo estéril ligeramente mojado con agua destilada. Limpiar toda el área presionando suavemente y si es posible con un solo hisopo (24).

7.2. Saliva en marcas de mordeduras.

Recoger la mancha con un hisopo estéril ligeramente mojado con agua destilada. Limpiar de forma circular la marca dejada por los dientes y toda el área interior que delimita (24).

7.3. Uñas

Examinar las manos y uñas de la víctima, recogiendo con unas pinzas los pelos o fibras que puedan existir y posteriormente cortar el borde superior de las uñas para analizar en el laboratorio la posible presencia de restos de sangre y piel. Recoger por separado las uñas de ambas manos en un papel, envolverlas con cuidado e introducir en bolsas de papel pequeñas (17).

7.4. Pelos dudosos

Deben ser recogidos con unas pinzas, colocando cada pelo o grupo de pelos en un papel pequeño que será doblado con cuidado e introducido en una bolsa de papel pequeña (25).

8. AGRESIONES SEXUALES

Las agresiones sexuales, por ser un tipo de delito en el que se requiere una información muy particular tanto de los hechos como de la víctima y una recogida de muestras muy estandarizada, necesita verse por separado en esta investigación, donde se va a detallar tanto la información requerida como las muestras que son imprescindibles para llevar a cabo un estudio adecuado sobre este tipo de agresión (24).

8.1. DOCUMENTACIÓN REQUERIDA

Para poder realizar una selección adecuada de las muestras que se deben analizar y para poder valorar los resultado del análisis(que suele ser bastante complejo en este tipo de casos), es imprescindible conocer una serie de datos sobre los hechos y la víctima, para lo que es necesario que el Médico Forense obtenga esa información que debe remitir junto con las muestras, para lo cual se debe llenar un formulario específico para este tipo de agresiones en el que deben constar los siguientes datos(24):

- Formulario de envío de muestras para agresiones sexuales.
- Datos de la víctima
- Edad
- Sexo
- Grupo poblacional
- Relaciones sexuales próximas a la agresión (especificar tipo, fecha y hora)
- Uso de productos vaginales (lubricantes, desodorantes...etc.)
- Si se ha lavado antes del reconocimiento.

- Si lleva la ropa de la agresión
- Datos del reconocimiento ginecológico que puedan ser de interés.
- Datos de la agresión
- Lugar de los hechos
- Fecha y hora de los hechos
- Tiempo aproximado transcurrido entre los hechos y la toma
- Tipo de agresión:
 - Penetración: vaginal, anal y/o bucal.
 - Introducción de objetos: vaginal o anal.
 - Otros: cunilingus, tocamientos...etc.
- Números de agresores
- Relación de parentesco víctima-agresor
- Si hubo uso de preservativos.
- Si hubo eyaculación y si fue interior o exterior.

8.2. RECOGIDA DE INDICIOS BIOLÓGICOS

La selección de indicios biológicos, que se realizarán será teniendo en cuenta los antecedentes y datos aportados por la víctima. En este tipo de tomas es fundamental numerar los hisopos, para comenzar los análisis por el que haya sido recogido en primer lugar (24).

- 2 tomas bucales. Se recogerán los posibles restos de semen con hisopos estériles que se pasaran con cuidado y sin frotar mucho, por debajo de la lengua, alrededor de las encías, de los dientes y el paladar.
- Esta es la primera toma que debe realizarse porque en la boca los restos de semen desaparecen con cierta celeridad.
- Superficie corporal. Hay que buscar manchas de semen o saliva así como posibles mordeduras que deben recogerse con hisopos estériles.
- Peinado de vello púbico y recogida de pelos dubitados, sobre un papel que será doblado con cuidado e introducido en una bolsa de papel pequeña.
- 2 tomas cervicales, 2 tomas vaginales y 1 toma de genitales externos. Se realizarán con hisopos estériles, limpiando con cuidado el cuello uterino, la cavidad vaginal y la región vulvar.
- Lavado vaginal que se llevara a cabo después de la toma con hisopos, para lo cual se utilizarán unos 10 mL de suero

fisiológico estéril que se recogerá en un tubo o frasco de plástico.

- 2 tomas anales y 1 toma del margen anal mediante hisopos estériles, limpiando con cuidado el conducto ano rectal y el margen anal, respectivamente.
- Las ropas vestidas por la víctima en el momento de la agresión que deben envolverse por separado en papel e introducirse en bolsas de papel independientes.

8.3. RECOGIDA DE MUESTRAS EVIDENTES

Muestras evidentes de la víctima. Además de las anteriormente descritas en muestras indubitadas en personas vivas, en los casos de agresión sexual hay que enviar de 10 – 15 vellos pubicos.

Muestras evidentes del sospechoso (cuando proceda) son las mismas que se recogen para la víctima (24).

9. RECOGIDA DE MUESTRAS EN CASO DE LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA DE LA PATERNIDAD

Cuando el presunto padre, el hijo y/o la madre están vivos Se recogen las muestras evidentes en personas vivas.

Cuando el presunto padre biológico ha fallecido

- Análisis a partir de restos óseos y piezas dentales procedentes de la exhumación del cadáver
- Análisis de muestras biológicas del fallecido existentes en centros hospitalarios o en el ámbito familiar
- Análisis de muestras biológicas procedentes de familiares del fallecido.

Investigación de la paternidad a partir de restos fetales. Se siguen las recomendaciones para la recogida de restos fetales anteriormente descritas al igual que para las muestras de la madre y el supuesto padre (19).

10. SISTEMA DE EMPAQUETAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

La adecuada preservación de las muestras desde su recolección hasta su llegada al laboratorio es fundamental, ya que los indicios biológicos, especialmente los indicios húmedos y los líquidos son vulnerables a la degradación del ADN en pocas horas. Por ello es fundamental realizar un correcto empaquetado y que los indicios líquidos, los tejidos blandos, oréanos y los indicios húmedos (si por algún motivo no es posible dejarlos secar) se mantengan y envíen refrigerados

Además es imprescindible que todos los recipientes, ya sean tubos, bolsas, cajas...etc., estén correctamente identificados y precintados. Ya que esto es lo que nos va a garantizar la autenticidad e integridad de las muestras.

10.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

En todos los recipientes debe haber un espacio reservado para la identificación de las muestras, en el que debe constar:

- El número de referencia de las muestras.
- Tipo de muestra.
- A quien pertenece y/o la localización.

10.2. CADENA DE CUSTODIA

También debe haber un espacio dedicado a la cadena de custodia en el que debe constar:

- Nombre o identificación y firma de la persona que realiza la recogida.
- Fecha y hora de la recogida.

10.3. SISTEMAS DE EMPAQUETADO

En la actualidad hay numerosos tipos de recipientes que nos pueden servir para empaquetar las muestras e incluso se están desarrollando algunos kits que pueden tener gran interés.

A continuación vamos a describir algunos sistemas de empaquetado en función de las muestras o vestigios que se quieran enviar al laboratorio (24).

10.3.1. Tubos con indicios líquidos

Los tubos con indicios líquidos serán introducidos en tubos de transporte con cierre irreversible, que serán correctamente identificados y se mantendrán y enviarán refrigerados al laboratorio, lo más rápidamente posible.

10.3.2. Frascos o recipientes con indicios líquidos o con órganos, tejidos blandos...etc.

Estos recipientes que deben tener un cierre de rosca o hermético serán precintados, correctamente identificados y se mantendrán y enviarán al laboratorio, lo más rápidamente posible.

10.3.3. Hisopos estériles en seco.

Una vez recogidos los vestigios, los hisopos serán empaquetados en cajas de cartón pequeñas comercializadas de forma especial para tal fin. Este tipo de cajas permite que los hisopos estén protegidos y se sequen totalmente. Una vez identificadas serán preselladas y enviadas al laboratorio sin refrigerar.

Si no es posible disponer de estos kits, los hisopos, una vez recogidos los vestigios biológicos, deben identificarse o numerarse y dejarse secar

totalmente a temperatura ambiente, en un lugar protegido, antes de ser introducidos en sus fundas. Posteriormente se introducen en las fundas que serán correctamente identificadas y precintadas para su envío al laboratorio.

10.3.4. Muestras con manchas secas

Cada muestra será colocada sobre un papel (para que no se pierdan indicios biológicos como pelos, costras...etc.) que será doblado e introducido en una bolsa de papel precintada y correctamente identificada. Enviar al laboratorio sin refrigerar.

10.3.5. Pelos dudosos.

Deben ser recogidos en papeles pequeños que serán doblados con cuidado y posteriormente introducidos en bolsas de papel precintadas y correctamente identificadas. Enviar al laboratorio sin refrigerar (25).

10.3.6. Costras, raspaduras, uñas...etc.

Deben ser recogidas en papeles pequeños que serán doblados con cuidado y posteriormente introducidos en bolsas de papel precintadas y correctamente identificadas y enviadas al laboratorio sin necesidad de refrigerar.

10.3.7. Huesos y dientes.

Se introducen en bolsas de papel y cajas de cartón adecuadas a su tamaño, que deben ser precintadas y correctamente identificadas, pudiendo enviarse al laboratorio sin refrigeración.

Los huesos, si por algún motivo mantienen restos de putrilago, deben ser introducidos en recipientes plásticos de cierre hermético que serán precintados y correctamente identificados, manteniéndose y enviándose refrigerados al laboratorio, lo más rápidamente posible.

IV. METODOS DE ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

1. EXTRACCIÓN DE ADN

Una vez obtenida la evidencia biológica del lugar de los hechos se procede a realizar la extracción del ADN

- Se puede realizar por técnica orgánica para tejidos, tejido putrefacto y huesos
- Técnica inorgánica para saliva, sangre, semen, cabello
- Técnica de uso de kits comerciales

Técnica orgánica. Esta basada en la digestión proteínica de membranas celulares y la separación de ADN por gradientes de solubilidad en extracción líquido-líquido.

Técnica inorgánica. Se basa en el uso de resinas quelantes que contienen afinidad por iones metálicos polivalentes, contienen grupos que actúan como grupos quelantes.

- **Técnica de uso de kits (DNA-IQ).** Afinidad eléctrica de ADN mediante una resina magnética para formar resina-ADN y con ayuda de una barra imantada se hace posible la extracción de ADN.

2. AMPLIFICACIÓN GENÉTICA

Para la amplificación genética existen metodologías como son:

2.1. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA RFLP

Consiste en la generación de fragmentos de diferentes longitudes a través de la digestión enzimática, con enzimas de restricción Haell, las cuales cortan al ADN en sitios específicos cada vez que encuentran secuencias determinadas (26).

Pasos de la técnica

1. Extracción del ADN
2. Digestión y ruptura del ADN
3. Separación electroforética de los fragmentos
4. Desnaturalización de la doble cadena.
5. Transferencia a una membrana.
6. Hibridación de los fragmentos con sondas específicas.
7. Detección de los productos hibridados.

Ventaja. Gran polimorfismo, la probabilidad de que dos personas tengan bandas iguales es de 1 a 250 (27).

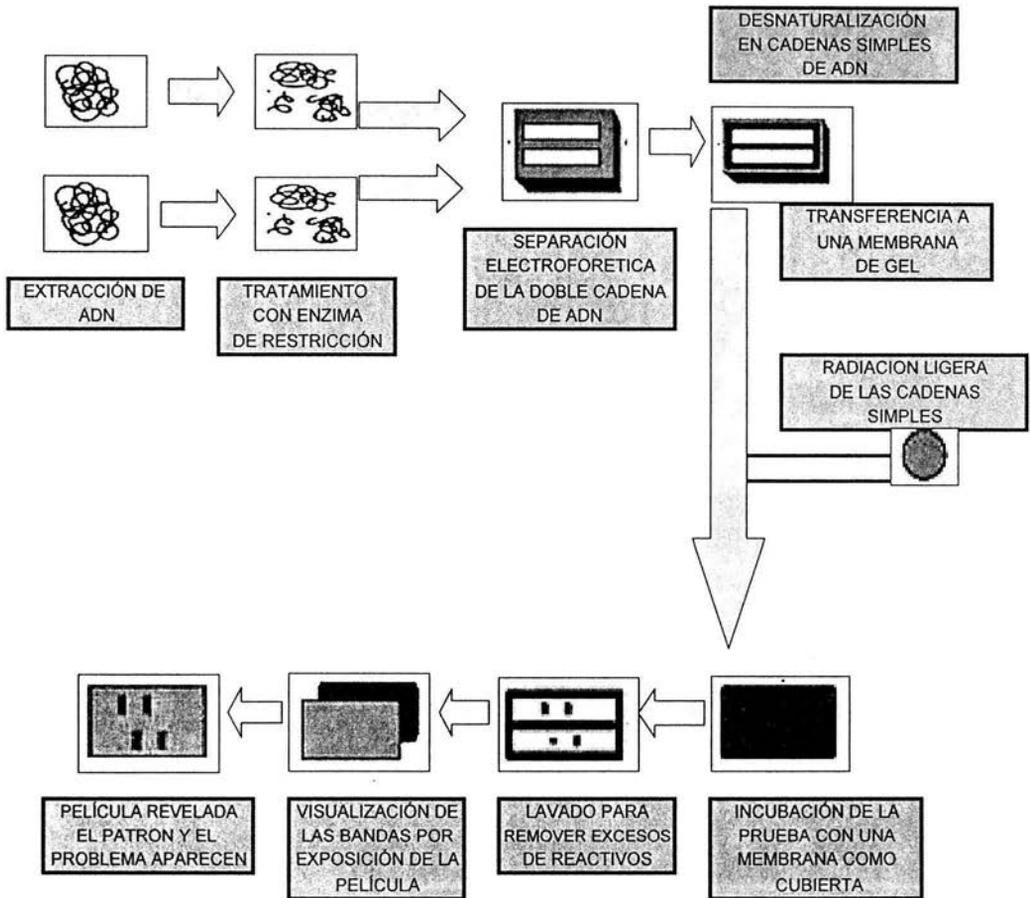
Desventajas. Requiere de ADN integro pero para el ámbito forense es una desventaja ya que el ADN que se llega a encontrar como indicio esta degradado.

Complejidad de la técnica

Para el ámbito forense se encuentran pequeñas cantidades de ADN y esta técnica requiere cantidades mayores para su análisis (28).

BASES PARA EL ANÁLISIS DEL RFLP

DIAGRAMA DE FLUJO



2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

Es un proceso in Vitro que permite incrementar la cantidad de un fragmento pequeño de ADN previamente seleccionado. La PCR puede ser considerada como un proceso de fotocopiado molecular (29).

Procedimiento analítico

- Componentes:
1. ADN problema
 2. Primers (oligonucleótidos)
 3. Amortiguador
 4. Enzima (taq polimerasa)
 5. Termociclador.

Etapas de PCR

1. Desnaturalización. La doble cadena se separa en dos cadenas simples. (95 grados centígrados)
2. Emparejamiento o annealing. Las cadenas se vuelven a unir, principio de complementariedad de bases. (62 a 65 grados centígrados)
3. Extensión. Situados los primers en su posición, aumentando la temperatura a 72 grados, la taq polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza con el fin de amplificar un segmento de ADN a través de una serie de ciclos repetitivos consistentes en tres pasos: El primero es la desnaturalización por calor del ADN de la bacteria o virus o de alguna célula humana fuera el caso de la búsqueda de algún rasgo genético. Luego de desnaturalizado el ADN, se realiza la separación física de las dos cadenas (de acuerdo al modelo de Watson y Crick el ADN está formado por 2 cadenas complementarias) mediante la incubación de la muestra con temperatura elevada. Estas permanecerán separadas libres en la solución hasta que la reacción sea enfriada para permitir que los "primers " o "sondas" (secuencias específicas complementarias que se añaden a la reacción) se unan a las secuencias blanco ó buscadas y se realice la hibridización (segundo paso).

El tercer paso consiste en la polimerización, elongación o extensión del complejo (sondas + ADN) mediante cambios cíclicos de temperatura repetidos un gran número de veces y por la acción de una enzima llamada "Taq DNA polimerasa" la cual es muy termoestable y es la que en buena

cuenta ha permitido automatización del proceso PCR en una forma relativamente sencilla (30-31).

Ventajas.

- Se lleva a cabo amplificación de indicios muy pequeños.
- Análisis de indicios degradados
- Detección es no radioactiva.
- Facilidad de interpretación.
- Disminución de probabilidad de error.
- El tiempo de análisis es menor.

Desventajas.

- Inhibición de la técnica por agentes químicos, telas...etc.(28, 29,32)

3. TIPIFICACIÓN

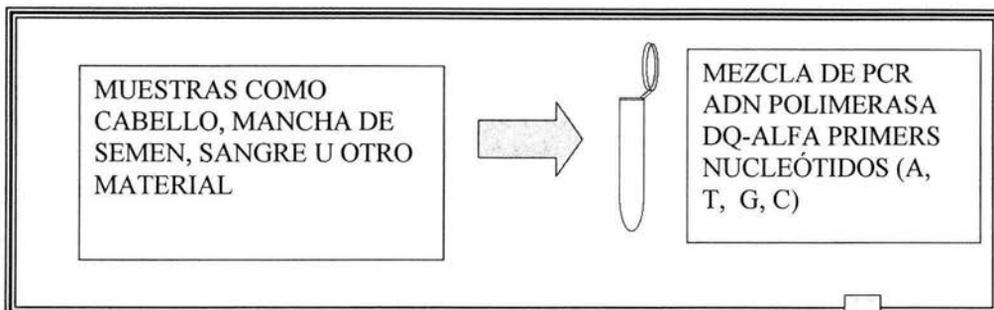
SHORT TANDEM REPEATS STRs

Son microsatélites que están compuestos por secuencias repetidas en tandem, cada una de las cuales tienen entre 2 y 7 pares de bases de longitud, en la actualidad se usan loci que tienen repeticiones en tandem de 4 pares de bases (tetranucleótidos).

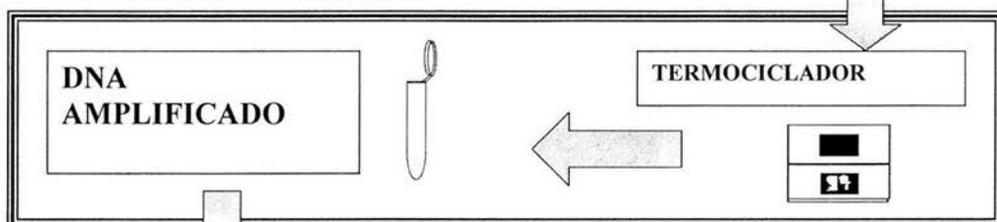
Ventajas.

- Amplificación de hasta 16 marcadores en una reacción.
- Muy sensible (menos de 1 ng de DNA)
- Muestras degradadas
- Probabilidad del 99.99 %

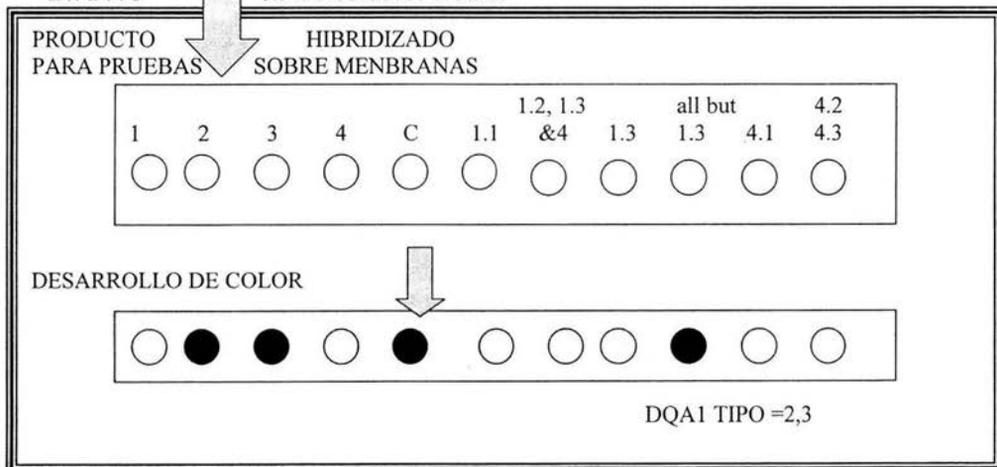
ETAPA 1 EXTRACCIÓN DE ADN



ETAPA 2 AMPLIFICACIÓN DE ADN



ETAPA 3 TIPIFICACIÓN DE ADN



El proceso de PCR para tipificación de sangre, semen y otros materiales por DQA es un proceso de tres etapas. El tipo DQA1 es obtenido por lectura de patrón corrido sobre una tira de nylon. (30).

V. PROBLEMA PLANTEADO

El ADN es la molécula fundamental para la composición genética de cada individuo, es un componente en cada célula del cuerpo humano de ahí que no existan dos personas con el mismo ADN, salvo los gemelos idénticos.

Dentro del campo forense existen diversos delitos en donde la dinámica de transferencia de indicios entre víctima, victimario y lugar de los hechos generalmente es sangre, semen, saliva, cabellos o tejidos. El estudio de estos indicios es de bastante utilidad en química legal en casos de violación e identificación de cadáveres y personas (33).

Las metodologías relacionadas con el estudio forense del ADN, requieren de infraestructura y equipo especial que no poseen la mayoría de los laboratorios forenses en México, actualmente las instituciones procuradoras de justicia necesitan contar con laboratorios de genética diseñados y equipados adecuadamente para realizar este tipo de pruebas, así como dar una capacitación de alto nivel al personal que realice este tipo de pruebas (esta tesina pretende facilitar a los interesados en esta ciencia, la búsqueda de métodos, ya que las referencias respecto a este tema se encuentran dispersas y poco accesibles).

VI. OBJETIVOS

- Recopilar información sobre las diferentes muestras para la identificación del ADN utilizadas como evidencia en química legal

- Describir la importancia del ADN como evidencia en la identificación postmortem.

- Caracterizar las diferentes evidencias biológicas en el lugar de los hechos en casos de homicidios como posibles fuentes de ADN para la identificación postmortem.

VII. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se analiza en los fluidos del cuerpo, las manchas, y otros tejidos biológicos recuperados como evidencia. Se comparan los resultados de análisis de ADN de muestras biológicas con los resultados de análisis de ADN de muestras conocidas. Este análisis puede asociar a la víctima(s) y/o sospechoso(s) entre sí o con una escena del crimen.

Dentro del campo forense existen diversos delitos en donde la dinámica de transferencia de indicios entre víctima, victimario y lugar de los hechos generalmente es sangre, semen, saliva, cabellos o tejidos. El estudio de estos indicios es de bastante utilidad en química legal en casos de violación e identificación de cadáveres y personas (34).

Así pues en el campo forense el estudio del ADN ha permitido resolver muchos crímenes, también se ha llevado a cabo la exoneración de personas que han sido declaradas culpables injustamente y sobre todo se ha logrado la identificación de cadáveres y personas vivas

VIII. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ADN

Tres tipos de resultados pueden obtenerse del análisis del ADN:

La inclusión, la exclusión, e inconcluso.

Inclusión: Cuando el perfil de ADN de una víctima o sospechoso coincide con el perfil de ADN de la evidencia encontrada en el lugar de los hechos, el individuo es incluido como la posible fuente de esa evidencia.

Exclusión: Cuando el perfil de ADN de una víctima o sospechoso no coincide con el perfil de ADN de la evidencia encontrada en el lugar de los hechos, el individuo se excluye como el donador de la evidencia. Sin embargo la exclusión no implica la inocencia.

Inconcluso: Los resultados inconclusos indican que el perfil de ADN no incluye, ni excluye a un individuo como la fuente de la evidencia biológica. Los resultados inconclusos pueden ocurrir por muchas razones, como por ejemplo, la cantidad y calidad del ADN pueden ser insuficientes para interpretar los resultados.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gill P, Jeffreys A, Werret DJ. Forensic application of DNA fingerprints. Nature 318. 1985.
2. Inman K, and Rudin N. An introduction to forensic DNA analysis. Boca Ratón, Fla.: CRC Press, Inc., 1997.
3. Marx JL. Multiplying genes by leaps and bounds. Science 1988;240:1408..
4. Sheldon EL, Kellog DE, Watson R, Levenson CH and Erlich HA. Use of nonisotopic M 13 probes for genetic analysis: Application to HLA class II LOCI. Proc. Natl. Acad. Sci. 1986; 83:9085.
5. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA and Weiner AM. Generation of immunological specificity. In Molecular biology of the gene, 4 ed., California. 1987; p845..
6. National Commission on the Future of DNA Evidence. Postconviction DNA testing: recommendations for handling requests. Washington, DC: U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, 1999.
7. National Commission on the Future of DNA Evidence. What every law enforcement officer should know about DNA evidence.

Washington, DC: U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, 1999.

8. Coleman H and Swenson E. DNA in the courtroom: a trial watcher guide. Seattle, Wash.; GeneLex Corp., 1994.
9. Horn GT, Bugawam TL, Long CM and Erlich HA. Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-depent diabetes susceptibility. Proc Natl, Acad. Sci. 1988; 85:6012.
10. DNA technology in forensic science. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992.
11. Connors E, Lundregan T, Miller N and McEwen T. Convicted by juries, exonerated by science: case studies in the use of DNA evidence to establish innocence after trial. Washington, DC: U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, 1996.
12. National Research Council. DNA technology in forensic science. Washington, DC: National Academy Press, 1992.
13. Hammond, Holly A., and Caskey CT. Automated DNA typing: method of the future. Washington, DC: U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, 1997.
14. Burke T, and Bruford MW. DNA fingerprinting in birds. Nature 327 .1987.

15. Evaluation of forensic DNA evidence. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
16. Kwok S, Mack DH, Mullis KB, Poiesz B, Erdlich G, Blair D, Friedmann A, and Sninsky J. Identification of human immunodeficiency virus sequence by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J. Virol.* 1987; 61: 1690.
17. Gill P, Jeffreys AJ, and Werrett DJ. Forensic application of DNA fingerprints. *Nature.* 1985; 318:577.
18. Weeden, Walter V, and Hicks JW. The unrealized potential of DNA testing. Washington, DC: U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, 1998.
19. Kenna, Judith A, Cecil JS, and Coukos P, "A reference guide on forensic DNA evidence." In Reference Manual on Scientific Evidence. Washington, DC: Federal Judicial Center, 1994.
20. National Research Council. The evaluation of forensic DNA evidence. Washington, DC: National Academy Press, 1996.
21. Inman, Keith, and Rudin N. An Introduction to forensic DNA analysis. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1997.
22. Handbook of forensic services: evidence examinations. Washington, DC: U.S. Department of Justice, FBI, 1999.

23. Giusti A, Baird M, Shaler R, and Balazs I. Application of deoxyribonucleic acid (ADN) polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm. *J. Forensic Sci.* 1986; 31:403.
24. Ledray, LE. Sexual assault nurse examiner (S.A.N.E.) Development and Operation Guide. Washington, DC: U.S. Department of Justice, Office for Victims of Crime, 1999.
25. Higuchi R, Beroldingen CH, Sensabaugh GF and Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature* 1988;332:543.
26. Erlich HA, Gelfand DH and Saiki RK. Specific DNA amplification. *Nature* , 1988; 331:461.
27. Wayne JS and Fournay RM. " Forensic DNA typing of highly polymorphic VNTR loci", in *Forensic science handbook, Vol 3*, R.Saferstein, ed. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, 1993.
28. Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:335.
29. Mullis, Kary. " The unusual origin of the polymerase chain reaction " *Scientific American.* April, 1990.

30. Sensabaugh GF, and Blake ET, " DNA analysis in biological evidence: application of the polymerase chain reaction", in forensic science handbook, Vol 3, R. Saferstein, ed. Englewood Cliffs, N.J. Prentice Hall, 1993.

31. Wallace RB, Shaffer, Murphy RF, Bonner J, Hirose T and Itakura K. Hibridization of synthetic oligodeoxynucleotides to DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 6:3543.

32. Martínez L. Begoña. "La prueba del ADN en medicina forense ". Ed. Masson.S.A., 1999.

33. Kobilinsky L, " Deoxyribonucleic acid structure and function- a review," in forensic science handbook, Vol 3, R. Saferstein, ed. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, 1993.

34. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R and Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: Toward DNA fingerprinting of single cells. Nucleic acids Res. 1988; 16:10953.