



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

## IMPORTANCIA DE LA PCR EN LA QUIMICA FORENSE

### TESINA

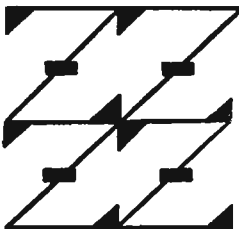
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

MIRIAM PALACIOS VILLA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA



LO HUMANO  
EJE

DENUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

2005

m345420



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.

## Dedicatoria

A Dios por no abandonarme en mi camino.

A mis padres en especial a mi mami, Isabel, gracias por tu apoyo incondicional, sin ti no lo hubiera logrado. Por estar conmigo en los momentos más difíciles y no dejarme caer. Gracias linda por ser la mejor madre del mundo. Te quiero v. ch.

A mis hermanitas Mildred y Liz, por apoyarme en todo momento, por estar conmigo siempre. Mil por tus consejos, Lache por decirme la verdad así fuese muy dura. Las quiero B(s).

A mi mejor amigo Ricardo Beltrán. Por haber estado para mí en todo momento, por tu consuelo, tus consejos, por no dejarme claudicar. Por hacerme sentir que no estoy sola que Dios está conmigo. Gracias por compartir conmigo tus malos y buenos momentos.

A Efrén Domínguez. Por estar conmigo desde hace 14 años. Por tu apoyo y comprensión. Por enseñarme que el trabajo duro es el camino al triunfo, que el que persevera alcanza. Por tu paciencia. Gracias por estar conmigo en los peores y mejores momentos de mi vida.

## Agradecimientos

Gracias Sra. Aurora Parrazal por brindarme su amistad y su casa. Por motivarnos a seguir y estar con nosotros en las noches de desvelo.

A la Dra. Martha Legorreta Herrera, por su enseñanza, y por el tiempo dedicado.

Al profesor Valentín Islas, gracias por la oportunidad que me brindo para titularme, por su enseñanza, tiempo y paciencia.

Al profesor Zamorano, por motivarme a seguir adelante. Porque aunque fue poco el tiempo compartido me enseñó a tener confianza en mí misma.

A todos los compañeros que estuvieron conmigo en la licenciatura, en especial a mis amigos Miguel Guerra, Roberto C. Huerta, Norma Sánchez y Diana Minerva.

A mis sinodales:

Dra. Martha Legorreta Herrera

Q.F.B. Ma. De las Mercedes Zamudio Durán

Mtro. Valentín Islas Pérez

Q.F.B. Francisco Javier Parada García

Q.F.B. Gabriel Alejandro Romero Días

Gracias por su tiempo, y sugerencias.

A la familia Domínguez, gracias por su amistad. En especial a la Sra. Trinidad y al Sr. Efrén, por recibirme en su casa, y por los buenos momentos.

A la familia Espinoza Parrazal, por su amistad y apoyo incondicional.

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>III</b>
<b>CAPÍTULO I ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.....</b>	<b>1</b>
<i>Características del ADN.....</i>	<i>2</i>
<i>Historia de la tipificación del DNA</i>	
<i>en el área legal.....</i>	<i>6</i>
<b>CAPÍTULO II REACCION EN CADENA</b>	
<b>DE LA POLIMERASA (PCR).....</b>	<b>9</b>
<b>2. Métodos utilizados para el análisis</b>	
<i>del ADN antes de la PCR.....</i>	<i>10</i>
<b>2.1 Reacción en cadena de la polimerasa ( PCR).....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Ventajas y desventajas de la PCR.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Aplicaciones de la PCR.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Metodología de la PCR.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO III ANALISIS DEL ADN.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Contaminación de indicios.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Precauciones en la recogida y envío al laboratorio</b>	
<i>de los indicios.....</i>	<i>26</i>
<b>3.1.1 Indicios biológicos provenientes de el</b>	
<i>lugar de los hechos.....</i>	<i>28</i>
<b>3.1.2 Muestras provenientes de delitos</b>	
<i>sexuales.....</i>	<i>32</i>
<b>3.1.3 Muestras provenientes de un occiso.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.4 Muestras provenientes de personas vivas</b>	
<i>para identificación o análisis de paternidad.....</i>	<i>35</i>
<b>3.2 Extracción del DNA.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Tipificación.....</b>	<b>38</b>

<b>CAPÍTULO IV PCR EN EL ÁMBITO LEGAL.....</b>	<b>48</b>
<b>4. Validaciones.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Casos forenses.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.1 Extracción de inhibidores de la PCR y la tipificación de DNA por STR en una mezcla de sangre humana y canina. ....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.2 DNA mitocondrial y tipificación por STR de material adherido a un auricular.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.3 Identificación de restos esqueléticos presumiblemente sumergidos en agua durante tres años por PCR-STR.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.4 La historia Abraham, Isaac y Jacob.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>59</b>
<b>5. Discusión.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Conclusiones.....</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>63</b>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<i>A</i>	Adenina
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ADNds</i>	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
<i>ADNmt</i>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<i>ADNs</i>	Ácido desoxirribonucleico de una sola cadena
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>ASO</i>	Oligonucleótidos alelo específicos
<i>C</i>	Citosina
<i>dNTPS</i>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<i>G</i>	Guanina
<i>HLA</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<i>µg</i>	Microgramos
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>RFLP</i>	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
<i>STR</i>	Cortas repeticiones en tandem
<i>T</i>	Timina
<i>VNTR</i>	Número variable de repeticiones en tandem
<i>UV</i>	Ultravioleta

## RESUMEN

Antes de la tipificación del ADN el método más exacto para relacionar a un sujeto a la escena de un crimen era la toma de huellas dactilares. Ahora se dispone de un método de identificación más confiable gracias a las técnicas de ADN recombinantes. El análisis del ADN en el área legal se utilizó por primera vez en 1987<sup>20</sup>. Se han utilizado muchas técnicas en la tipificación del ADN, como por ejemplo: Southern blot, espectrofotometría UV, etc., los cuales han presentado ciertas desventajas como es la cantidad de ADN ya que se necesitan mas de 1µg, las muestras de ADN obtenidas en el lugar del crimen muchas veces se encuentran por debajo de ésta cantidad, también se solicita una muestra de calidad, además de que el tiempo que se requiere en este tipo de estudios en de dos a tres días.<sup>5</sup>

Las limitaciones antes mencionadas fueron superadas por la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**, la cual fue descrita por **K. Mullis** a mediados de los 80's. La PCR es una técnica que se introdujo en los laboratorios forenses. Esta herramienta permite producir en el laboratorio grandes cantidades de un segmento del gen que se desea analizar y que está presente en muy bajas cantidades en el material clínico a investigar. Además no requiere el uso de costosos y riesgosos radioisótopos, y es practicable aún con tejido embebido ya sea en parafina o procedente de especímenes de museos, en descomposición o vestigios arqueológicos.

La PCR se realiza en ciclos, cada ciclo comprende tres pasos: 1) desnaturalización, 2) apareamiento y 3) extensión. Posteriormente, basta un análisis directo por cortes de enzimas de restricción o hibridaciones con sondas no reactivas para comprobar la identidad del gen amplificado<sup>17</sup>.

La PCR se utiliza en muchos laboratorios y con múltiples aplicaciones en los diferentes campos de la biomedicina, este trabajo se enfocara al uso de la técnica de PCR en el ámbito legal en donde ha enriquecido el análisis de las pruebas de paternidad y la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente polimórficas<sup>11</sup>.



Este método proporciona pruebas decisivas para condenar o absolver a algún sospechoso.

Esta revisión permitirá entender que es la **PCR**, los beneficios que se han obtenido al utilizar este método, así como, determinar qué materiales corpóreos se utilizan para la obtención de la huella genética.

## INTRODUCCION

Uno de los métodos más exactos para vincular a un individuo a la escena de un crimen era la toma de huellas dactilares. Ahora se dispone de un método de identificación más confiable gracias a las técnicas de ADN recombinantes. Ésta se denomina a veces huella dactilar de ADN (también como registro o perfil del ADN), y en algunos aspectos es más poderosa que otros métodos de identificación <sup>59</sup>.

La determinación de la huella dactilar de ADN se basa en el polimorfismo de secuencia que se da en el genoma humano (y en el genoma de todos los organismos). Los polimorfismos de secuencia son, pequeñas diferencias secuenciales (generalmente cambios de pares de bases únicos) que se dan entre individuos una vez cada pocos cientos de pares de bases de promedio. Cada diferencia con respecto al genoma humano consenso se presenta normalmente en sólo una pequeña parte de la población, pero todos los individuos muestran alguna. Algunos de los cambios de secuencia afectan a dianas de restricción, originando diferencias en los tamaños de ciertos fragmentos de ADN producidos por digestión con un enzima de restricción, en individuos distintos. A la diferencia de tamaño se le conoce como polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción ("restriction fragment length polymorphisms, RFLP). La detección de RFLP se basa en un procedimiento de hibridación llamado "transferencia Southern blot". Las secuencias del ADN genómico que se usan en esta prueba son regiones que contienen ADN repetitivo, que son comunes en los genomas de eucariotas superiores <sup>7</sup>.

El número de unidades de repetición varía de un individuo a otro (excepto en el caso de gemelos idénticos). Si se elige una sonda apropiada, la distribución de bandas en este tipo de experimento puede ser distinta para cada individuo ensayado. Si se usan varias sondas, la prueba puede ser tan selectiva que es posible identificar a un individuo determinado de entre toda la población humana. Sin embargo, este procedimiento de transferencia Southern necesita muestras de ADN relativamente frescas y mayor cantidad de ADN del que hay

normalmente presente en la escena del crimen<sup>13</sup>. Se han utilizado otras técnicas como la espectroscopia UV, pero tienen sus limitantes por lo cual se diseñó la técnica de PCR a mediados de los 80's por Kary B. Mullis, en ese entonces investigador en la compañía CETUR, en Emerville, California (E.U.). En años posteriores la PCR fue perfeccionada por otros investigadores del mismo grupo y se aplicó exitosamente en el diagnóstico clínico de la anemia de células falciformes.<sup>51 y 53</sup>

Los primeros ensayos de la PCR se realizaron en forma manual, utilizando para la amplificación al fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de la bacteria *Escherichia coli*.<sup>20</sup>

Desde su introducción, este método se ha desarrollado hasta el punto de construir pruebas decisivas en los tribunales del mundo entero. Los resultados obtenidos son útiles tanto para condenar como para absolver a cada uno de los sospechosos. Esta técnica también se puede utilizar para establecer la paternidad con un alto grado de confianza.

El método de estudio utilizado fue documental, se realizó una búsqueda retrospectiva, para observar los lineamientos que se seguían antes de la PCR en los laboratorios forenses, y actual para observar su perfeccionamiento y las ventajas que se han obtenido al introducir esta técnica a los laboratorios forenses.

El estudio de esta técnica es de gran importancia ya que continúa creciendo y la introducción de ésta a los laboratorios forenses proporciona una nueva arma, para impartir justicia en algún hecho presuntamente delictivo.

**CAPITULO I**  
**ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)**

**1. Características del ADN.....2**

**1.1 Historia de la tipificación del ADN en el área legal.....6**

## 1. CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÓTIDO (ADN)

El ADN se considera como una copia genética original y única de un individuo. Éste puede encontrarse en cada una de las células nucleadas del cuerpo de una persona, y permanece constante a lo largo de la vida.

La molécula del ADN es un polímero compuesto de 4 unidades o bloques básicos llamados nucleótidos, contienen un azúcar (desoxirribosa), fosfato y una base nitrogenada, como se indica en la figura.<sup>24</sup>

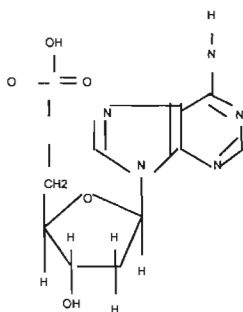


Fig.1. Estructura de un nucleótido. En la imagen aparece la deoxiadenosina-5'-monofosfato.

En el ADN hay cuatro nucleótidos diferentes, y esos nucleótidos difieren de uno u otro sólo en la base nitrogenada que contienen. Estas bases nitrogenadas son purinas y pirimidinas. Las purinas son adenosina (A) y la guanina (G); las pirimidinas son las citosina (C) y la timina (T).<sup>24</sup>

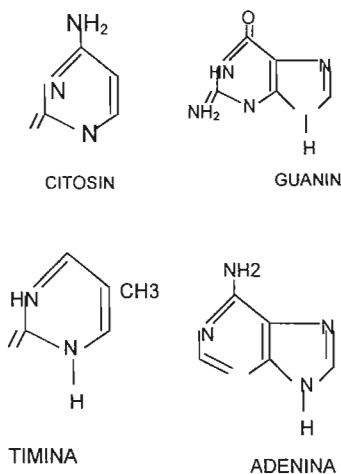
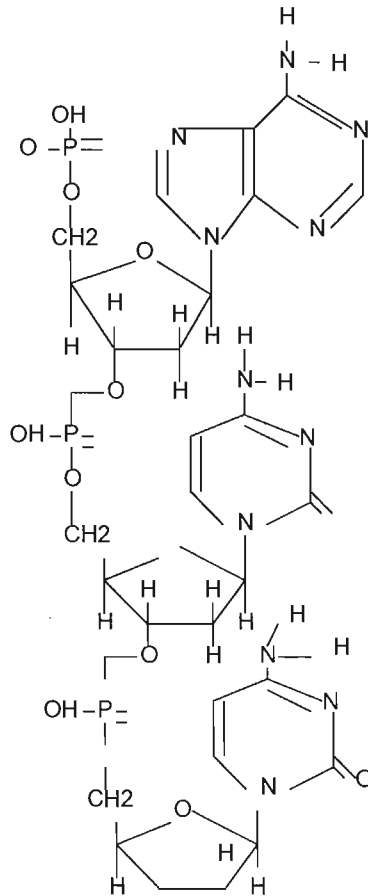


Fig 2

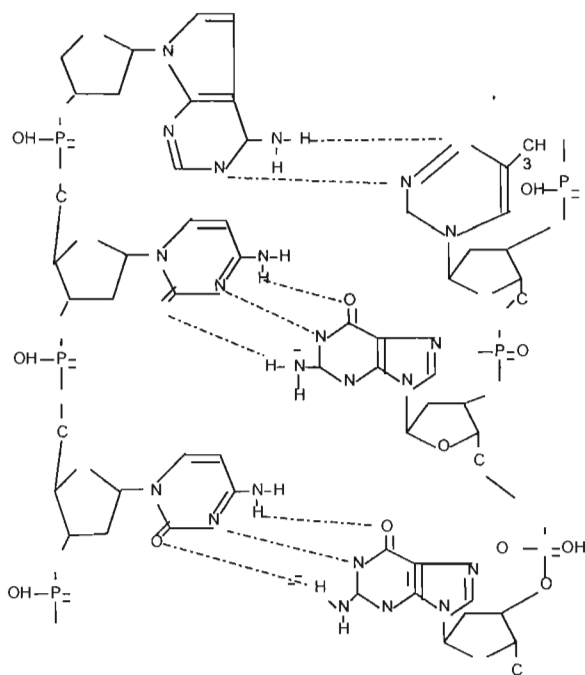
Una cadena simple de ADN está compuesta por una serie de nucleótidos unidos covalentemente a través de uniones fosfo-diéster entre el carbono del extremo 5' de la desoxirribosa del nucleósido y el carbono del extremo 3' de la desoxirribosa del nucleósido adyacente, como se muestra en la figura 3.<sup>24</sup>



**Fig. 3** Patrón de unión de los nucleótidos en una cadena simple de ADN. El grupo fosfato se une a las posiciones 3' y 5' de las moléculas sucesivas de desoxirribosa.

La molécula de ADN se compone de dos cadenas de polinucleótidos que forman una molécula helicoidal. Las dos cadenas se asocian con puentes de hidrógeno entre bases complementarias de cada cadena. Una *A* en una cadena sólo formará puentes de hidrógeno con una *T* en la otra cadena. De modo similar, *G* y

C en cadena opuesta formarán puentes de hidrógeno (Fig.4). Una pirimidina simple que está unida por los puentes de hidrógeno a su purina complementaria en la cadena opuesta es lo que se conoce como un "par de bases". Si la secuencia de una cadena polinucleotídica es conocida, el orden de la cadena complementaria puede ser deducido. Por ejemplo, si una cadena contiene la secuencia 5'-AAGATACAGCT-3, entonces la secuencia de la otra cadena es 3'-TTCTATGTCGAG-5'. Las cadenas opuestas que muestran uniones A-T y G-C se denominan complementarias. El emparedamiento en base a esta complementariedad contribuye a dar mayor estabilidad química a la molécula de ADN.<sup>24</sup>



**Fig. 4.** Ilustración de los patrones de los puentes de hidrógeno entre bases complementarias de las cadenas de ADN. El fenómeno de la complementariedad de las bases del ADN es la base de todas las técnicas de análisis de esta molécula.

La desnaturalización que es el proceso de separación del ADN en cadenas simples acontece cuando se desestabilizan los puentes de hidrógeno por exposición a altas temperaturas o por la acción de álcalis. Mientras que las

·cadenas simples están separadas, los enlaces covalentes fosfo-éster que unen los nucleótidos les hacen formar una cadena simple. En las condiciones apropiadas, dos cadenas complementarias de ADN se pueden unir juntas (a esto se le conoce como hibridación o annealing), siendo la altísima afinidad por las cadenas complementarias exactas lo que permite a las cadenas simples hibridarse con la correspondiente mitad entre miríadas de múltiples secuencias similares.<sup>24</sup>

La mayoría del ADN que hay en las células del ser humano está contenido en los 46 cromosomas, dentro del núcleo y se le denomina ADN nuclear. El ADN nuclear es diploide, y consiste en un conjunto de 23 cromosomas heredados de la madre y otro conjunto idéntico, de otros 23 cromosomas heredados del padre. Por ello la mayoría de los genes y marcadores genéticos están duplicados dentro de cada núcleo celular. Las diferentes formas posibles de un marcador genético se denominan *alelos*. Un individuo que tenga dos alelos similares para un marcador genético se denomina homocigoto, siendo heterocigotos los que tienen alelos diferentes dentro de un marcador genético. Debido a los mecanismos de la herencia biológica, las relaciones genéticas entre padres e hijos y entre hermanos pueden ser reducidas con marcadores genéticos.<sup>7, 22, 24</sup>



## 1.1 HISTORIA DE LA TIPIFICACIÓN DEL ADN EN EL ÁREA LEGAL

Originalmente, el análisis de marcadores proteicos, producto de los genes, era usado para diferenciar a los individuos. Un sistema clásico protéico es el sistema de grupos sanguíneos ABO, que se ha usado durante décadas en la identificación humana. Hay cuatro tipos comunes de sangre; A, B, O y AB. Si una gota de sangre encontrada en la escena del crimen era del tipo B, significaba que sólo las personas del tipo B pueden haberla dejado; personas con el tipo A, O y AB (en total un poco más del 90% de la población) eran excluidos como posibles orígenes de la gota de sangre. Otros marcadores proteínicos incluyen al suero y a los glóbulos rojos como el componente grupo-específico, transferrina, hemoglobina, fosfo-gluco-mutasa, fosfatasa ácida, estearasa-D, etc. Sin embargo, el uso de sistemas proteínicos, tiene sus desventajas como son: 1) la baja estabilidad de las proteínas en el medio ambiente, 2) el poder de discriminación relativamente bajo de los sistemas de uso y 3) porque los sistemas proteínicos no existen en todos los tejidos de las personas. No obstante, el análisis de los polimorfismos del ADN en vez de las proteínas, ofrece solventar muchos de los problemas.<sup>7</sup>

La capacidad de analizar el ADN de las muestras biológicas ha sido uno de los mayores avances en ciencia forense. Generalmente, cualquier material biológico que contenga células nucleadas, como sangre, semen, saliva, pelo, hueso o diente puede, en principio, ser susceptible de análisis de ADN y la amplia batería de marcadores genéticos, el análisis de los polimorfismos del ADN tiene mayor sensibilidad, es más específico y más informativo que los marcadores genéticos clásicos.<sup>7</sup>

La tipificación por ADN en el área legal se utilizó por primera vez en 1987, por un fiscal de Florida que estaba por intervenir en un caso de violación, éste se sintió intrigado por una anécdota según la cual en Inglaterra la policía había reunido muestras de 1000 individuos en un intento por comparar su ADN con las muestras de semen obtenidas de dos mujeres violadas y asesinadas, así que decidió ver qué tan dispuesto estaba el sistema legal en los Estados Unidos a aceptar los nuevos avances científicos. Utilizando una técnica creada menos de 10 años antes, varios científicos de un laboratorio neoyorquino compararon las muestras

de sangre del sospechoso Tommie Lee Andrews, empleado de 24 años de una compañía farmacéutica de Orlando, con las muestras de semen tomadas de los algodones con los que se había limpiado la vagina de la víctima.<sup>55</sup>

Las muestras coincidieron, y Andrews se convirtió en la primera persona en los Estados Unidos en ser condenada por un crimen con base en el carácter único de su ADN. Según los expertos de Lifecodes Corporation, donde se realizó la tipificación y comparación del caso Andrews, las probabilidades de que alguien posea el mismo patrón de ADN en las áreas sondeadas y sometidas a prueba, son de 1 en 10 mil millones.<sup>55</sup>

A finales de 1988, el FBI abrió sus instalaciones para tipificación por ADN en su laboratorio. También en 1988, varios laboratorios estatales, de condado y ciudadanos en todo el país comenzaron a reunir fondos y entrenar a sus serólogos forenses, así como a adquirir el equipo necesario para realizar la tipificación por ADN. Algunos empezaron a efectuar sus pruebas a finales de 1989.<sup>55</sup>

En poco tiempo, la tipificación del ADN ha adquirido el título de “huellas digitales genéticas”. Hay unas cuantas secciones de ADN que varía de un individuo a otro; estos segmentos polimórficos (variables) de ADN son los que hacen única a cada persona. Para los científicos que entre 1960 y 1970 estudiaron el ADN para comprender las diferencias entre las especies, estos enlaces polimórficos llegaron a ser conocidos como ADN chatarra. Sin embargo, para unos cuantos científicos como Ray White de la universidad de UTHA en Estados Unidos y Alec Jeffrey, de la universidad de Leicester en Inglaterra, estos segmentos polimórficos eran una manera adecuada de identificar a los individuos. White y Jeffrey empezaron a exponer sus teorías a principios de la década de 1980.<sup>53</sup>

El análisis del ADN permite al científico forense tanto excluir a personas que han sido falsamente asociadas con una muestra biológica relacionada con un delito, como reducir el número de posibles sospechosos a unos pocos, incluso a un posible individuo. La tecnología disponible actualmente comprende una miríada de marcadores genéticos, una variedad de estrategias técnicas válidas para el análisis, así como equipos informáticos con “software” especializado capaz de analizar todos los datos. Los métodos habitualmente usados incluyen el análisis

de los RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica), análisis de loci VNTR (número variable de repeticiones en tandem) y amplificación por medio de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con el subsiguiente análisis de marcadores genéticos específicos.<sup>7</sup>

La policía y los abogados acusadores informan que esta nueva técnica es infalible y que es la mejor forma de comparar las muestras de líquidos corporales hallados en la escena del crimen con los de determinada víctima o sospechoso.<sup>1, 3, 53</sup>

## **CAPITULO II**

### *HISTORIA DE LA PCR*

<b>2. Métodos utilizados para el análisis.....</b>	<b>10</b>
<i>de ADN antes de la PCR</i>	
<b>2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Ventajas y desventajas de la PCR.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Aplicaciones de la PCR.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Metodología de la PCR.....</b>	<b>19</b>

## 2. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE ADN ANTES DE LA PCR

El análisis del ADN en el área forense se ha realizado utilizando diferentes métodos. Algunas técnicas que se enfocaron a la cuantificación de ADN son la espectroscopia UV o por fluorescencia, en donde no se toma en consideración el origen de la especie. La absorción de la radiación ultravioleta es a una longitud de onda de 260 nm. Esta absorción es debida a las bases púricas y pirimidícas. El ADN bicatenario absorbe menos que el monocatenario debido a que la interacción de las bases complementarias en el ADN bicatenario reduce la absorbancia en el ultravioleta. La espectroscopia UV es un método simple usado, muchas veces como punto de referencia en otras técnicas. Las mayores desventajas de esta técnica son:

- La incapacidad para diferenciar entre ADNs (ADN de una sola cadena) y ADNds (ADN de doble cadena), a menos que en el estudio la desnaturalización sea dirigida.
- La absorción por ARN y contaminantes
- Ensayo poco sensible
- Se requiere de una gran cantidad de muestra: cuantifica en microgramos.

Los *fragmentos de restricción de longitud polimorfica (RFLP)* fueron el primer método usado para la identificación genética humana, y consiste en la generación de fragmentos de diferente longitud por digestión enzimática con endonucleasas del ADN. La estrategia del análisis con RFLP es la siguiente:

1) Extracción del ADN

2) Digestión y ruptura del ADN en fragmentos usando endonucleasas específicas

- 3) Separación electroforética de los fragmentos, de acuerdo a su tamaño, en geles de agarosa.
- 4) Desnaturalización de la doble cadena por inmersión en álcali (0.5 M de NaOH).
- 5) Se transfiere a papel de nitrocelulosa de tal modo que en el papel se reproduzca la distribución de fragmentos del gel las cadenas simples de ADN a una membrana por efecto capilar.
- 6) Hibridación de los fragmentos, inmovilización de ADN con sondas específicas marcadas radiactivamente.
- 7) Detección de las regiones hibridadas por autorradiografía o quimioluminiscencia.

Originalmente, la técnica de RFLP se usó para detectar la presencia o ausencia de secuencias cortas de ADN de estructura determinada, los denominados lugares o dianas de restricción. Una enzima de restricción reconoce una determinada secuencia corta que se encuentra a lo largo de la doble cadena de ADN, y corta por ese lugar. Al existir diferencias en la secuencias de diferentes individuos, estos individuos pueden tener fragmentos de restricción de diferente longitud que pueden ser usados comparativamente en la identificación. El ADN genómico no parece ser un sustrato válido para la caracterización individual por medio del análisis tipo RFLP, ya que la mayoría del ADN de los seres humanos es similar. Sin embargo, existen en el ADN polimorfismos genéticos, no relacionados con la codificación de proteínas, que son hipervariables. Un tipo de estos marcadores genéticos es conocido como número variable de repeticiones en tandem o VNTR (en inglés, variable number of tandem repeats) o minisatélites. Los VNTR están compuestos de secuencias repetidas en tandem (normalmente entre 9 y 80 bases por unidad de repetición) que muestran variabilidad dentro de la misma persona y

entre individuos en el número de repeticiones existentes en sus alelos. Tras la digestión con una enzima de restricción, la longitud de cada secuencia va a ser determinada por el número de repeticiones contenidas dentro de cada fragmento. La mayoría de los VNTR usados en la identificación humana tienen más de 100 tipos o alelos dentro de una determinada población. De hecho, muestran tal nivel de polimorfismo, que el estudio de 5 a 8 marcadores es suficiente para diferenciar la gran mayoría de los individuos no relacionados. En otras palabras, es muy difícil que existan dos perfiles iguales tras analizar varios marcadores VNTR.<sup>6,7</sup> En identificación humana, el análisis con RFLP del ADN ha sido predominantemente usado para identificar manchas de fluidos corporales encontrados en las escenas del crimen, así como para resolver casos de paternidad e inmigración ilegal. De hecho, cantidades tan pequeñas como 10-50 nanogramos de ADN son suficientes para analizar loci VNTR por medio de RFLP.<sup>6,7</sup>

#### ✓ 1VENTAJAS

- 1) GRAN POLIMORFISMO. Esto hace que realmente sea muy difícil que dos personas tengan los mismos alelos para un locus determinado. En términos estadísticos y de modo general, se ha calculado que la posibilidad de que dos personas escogidas al azar tengan dos bandas idénticas, es de 1 entre 250, haciendo posible que se puedan estudiar un número mayor de loci.

#### ❖ LIMITANTES

- 1) Requiere de una cantidad suficiente de ADN aproximadamente de 50 ng, propuesto por Budowle y Baechtel en 1990. Generalmente las muestras analizadas en el ámbito forense se encuentran degradadas y esta técnica requiere de ADN no degradado.
- 2) Necesita de materiales radioactivos.

- 3) Complejidad de la técnica. Además se requiere de mucho tiempo para obtener los resultados.<sup>22,15</sup>



## 2.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Una estrategia alternativa en el análisis forense del ADN es el uso de las técnicas basada en la *reacción en cadena de la polimerasa* (sus siglas en inglés PCR) descubierta por Kary Mullis a mediados de los 80's. La PCR es un proceso *in vitro* que incrementa la cantidad de un fragmento de ADN pequeño previamente seleccionado. La PCR puede ser considerada como un proceso de "fotocopiado molecular". Las características más importantes de la PCR es su capacidad de obtener relativamente grandes cantidades de un fragmento de ADN (nanogramos o picogramos). Comparada con la técnica de RFLP, la ventaja de la técnica de PCR incluye el aumento de la sensibilidad y especificidad, y la disminución del tiempo y trabajo del análisis. De hecho, el análisis de un caso de violación puede llevar sólo unos pocos días, siendo además un proceso susceptible de ser automatizado. Generalmente, un análisis exitoso de RFLP requiere de ADN relativamente bien conservado (>20.000 pares de bases). Por el contrario, la PCR permite el análisis de algunas muestras cuyo ADN está muy degradado, porque los alelos que se estudian son de un tamaño mucho menor comparados a los analizados por RFLP. Por ello la PCR, es una herramienta especialmente valida en el campo forense de la identificación humana, donde puede haber ADN degradado debido a la antigüedad de la muestra, a la exposición medioambiental o a los productos químicos. De hecho se pueden extraer cantidades mínimas de ADN de diferentes sustratos como:

- 1) Sangre, semen, saliva y restos de sudor depositados en diferentes lugares como ropas, cigarrillos, sellos y estampas postales, sobres y cartas, vasos y botellas, chicles y máscaras usadas en la cara.
- 2) Hisopos vaginales obtenidos de víctimas de violación.
- 3) Tejidos diversos de restos humanos.
- 4) Objetos personales, como cepillos y peines, cepillo de dientes y máquinas de afeitar.<sup>38</sup>

## 2.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PCR

### ✓ VENTAJAS

1.- Amplificación de ADN de indicios muy pequeños. Es la principal ventaja que ofrece esta técnica para la ciencia criminalística ya que es posible analizar el ADN proveniente de un solo cabello, o la saliva depositada sobre una colilla de cigarro. Cantidades tan pequeñas como 0.1 nanogramos, pueden ser suficientes en condiciones ideales para conseguir resultados de amplificación de un locus.

2.- PCR Múltiplex. Es posible amplificar simultáneamente varios fragmentos de ADN de nuestro interés en una sola reacción de PCR, que luego han de ser separados electroforéticamente en condiciones especiales que permitan la identificación aislada de cada uno de los fragmentos.

3.- Análisis de indicios degradados o contaminados. El tamaño de los fragmentos analizados es muy pequeño, oscila entre 200 y 1000 pares de bases. Esto les confiere una gran estabilidad y resistencia a la degradación de cualquier tipo (físico, químico o biológico). En consecuencia, será mucho mas probable obtener resultados positivos si estudiamos un fragmento que posee 300 pares de bases (Short Tandem Repeats, STR) , que si analizamos uno que contiene 30000: por lógica es mas difícil que se rompa el fragmento mas pequeño que el mas grande.

4.- Tiempo. Es posible ofrecer datos iniciales en 24-48 hrs., en los casos favorables en que es posible aplicar técnicas de extracción rápida (chelex) y donde no surjan problemas de cuantificación de ADN. Esta técnica permite también procesar un mayor número de muestras a la vez.

5.- Facilidad de interpretación de resultados. Toda muestra desconocida debe de ser analizada por comparación directa de un marcador alelico de referencia.

6.- Disminución de la probabilidad de error. El error disminuye no sólo a la hora de la interpretación de resultados, sino también al disminuir la manipulación de las muestras.<sup>38</sup>

❖ *DESVENTAJAS*

1.- Presencia de contaminación biológica.- Por ser una técnica capaz de amplificar cantidades muy pequeñas de ADN, es posible que los indicios analizados estén contaminados con muestras provenientes de personas ajenas, lo que se descubre cuando en el análisis aparecen alelos provenientes de más de una persona.

2.- Ausencia de amplificación. Es posible que existan factores que impidan que se lleve a cabo la reacción de amplificación, lo anterior debido a que los fragmentos que se estén analizando, aunque sean muy pequeños se encuentren ya degradados por condiciones físicas o químicas o bien porque existan en las muestras elementos contaminantes que inhiban la reacción de PCR (colorantes, tóxicos, reactivos químicos, metales, etc.).<sup>38</sup>

### 2.3 APLICACIONES DE LA PCR

La PCR tiene múltiples aplicaciones en los diferentes campos de la biomedicina, dentro de los cuales se pueden mencionar: Genética Médica, se usa para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y de algunas cromosomopatías comunes; en Inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes; en oncología es útil para evidenciar mutaciones activadoras de oncogenes o supresores de antioncogenes, para detectar rearrreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos y para detectar virus y secuencias oncogénicas; en microbiología se ha utilizado en el diagnóstico rápido y altamente específico de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo, como es el caso de las micobacterias.<sup>46,48</sup>

El proyecto del genoma humano ha recurrido a la PCR para la identificación de nuevos genes, sus secuencias y mutaciones. La Arqueología ha encontrado en la PCR una herramienta poderosa para el análisis genético de muestras biológicas procedentes de momias y fósiles. En el estudio de la evolución, su aplicación a estudios de secuencias conservadas ha acelerado la reconstrucción de árboles filogenéticos y se ha convertido en el instrumento más accesible para el análisis de especies en vía de extinción.<sup>46,48</sup>

En biología Molecular, Ingeniería Genética y biotecnología, la PCR es utilizada para la clonación molecular de genes y su secuenciación nucleotídica, para la mutagénesis dirigida, para manipulaciones génicas encaminadas a la producción de proteínas recombinantes y para el análisis y la cuantificación de la expresión génica. Finalmente, la Biotecnología animal y vegetal también se ha beneficiado con esta metodología, al aumentar el arsenal de herramientas para el mejoramiento de plantas y animales.<sup>46,48</sup>

La PCR en el área forense tiene gran importancia ya que ha enriquecido el análisis de las pruebas de paternidad y la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente polimórficas. Un estudio realizado en 1990 por Hugichi et al.<sup>21</sup> reporta que la

tipificación del ADN de un solo cabello amplificando la región polimórfica del locus HLA DQa y la región genética variable del ADN mitocondrial nos ayuda a lograr tal objetivo. En 1992 Atsushi et al.<sup>3</sup> determinaron el sexo por medio de la PCR haciendo un análisis de el gen amelogenina homólogo de X-Y, el cual es sumamente fidedigno desde la detección de un fragmento amplificado específico de X lo que valida al procedimiento. La primera parte está basada en la amplificación de la sucesión de DYZ1 repetitiva en el brazo largo del cromosoma Y, mientras que en la segunda parte, se amplifica en gen amelogenina homólogo de X-Y. En donde se llegó a la conclusión de que la familia repetitiva DYZ1 no es específica de X ni de Y, por lo cual se pueden obtener falsos positivos. En cambio el gen amelogenina amplificado diferenció entre X y Y basándose en la diferencia de tamaño. La determinación del sexo es de gran importancia, y la PCR es un método poderoso para la amplificación de material genético en cantidad pequeña o una célula de una muestra de tejido.<sup>21</sup>

Otra aplicación en el área legal es la prueba de paternidad. Ann Bjerre<sup>2</sup> en 1997, publicó un informe acerca de las pruebas de paternidad realizadas en 1995 (con la participación de 18 laboratorios) y 1996 (con la participación de 21 laboratorios), demostrando que por la eficiencia de la PCR en 1995 el 62% de los laboratorios usaban el método de PCR, y el 1996 e 100% de los laboratorios basaban sus métodos en el PCR.<sup>19, 20, 32, 41, 42, 45 y 48</sup>

## 2.4 METODOLOGÍA DE LA PCR

La PCR es en principio, y muchas veces también en la práctica, fácil de ejecutar. Los componentes de reacción además del ADN son:

- ADN polimerasa: La PCR requiere de una enzima polimerasa termoestable, lo cual es esencial ya que debe tolerar las diferentes temperaturas requeridas para la desnaturalización, hibridación y síntesis de ADN. Generalmente es la taq polimerasa extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*. Su temperatura óptima es de 72 °C, siendo capaz de resistir cambios sucesivos a 95 °C, lo que hace posible la automatización del procedimiento. Tiene actividad 5' ---- 3', pero no 3' --- 5', por lo que no corrige errores. También se puede usar Hotstart polimerasa ( Taq termoactivable, Taq bead), que son enzimas manipuladas genéticamente para que la actividad enzimática se inicie a 90 °C, con esto se evita la generación de productos inespecíficos. Se puede recurrir también a las polimerasas correctoras que son enzimas aisladas de otra fuente diferente a *T. aquaticus* con esto se logró tener enzimas con menos promedio de error, generalmente son aisladas de *Pyrococcus furiosus*.
- Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs): Son los eslabones clave para que la polimerasa pueda extender los primers para dar lugar a los fragmentos amplificados.
- Amortiguador: que contiene 10mM de Tris (pH 8.4), 50mM KCl y 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, el cual es el cofactor que utiliza la Taq polimerasa para su activación, su concentración debe optimarse.
- Primers: Delimita el fragmento interesado. Se requieren dos, sentido y antisentido, son pequeñas hebras de ADN de unas 20 bases capaces de hibridarse de modo específico gracias a la complementariedad de bases, sobre la hebra de ADN y sobre su hebra complementaria.

Todos los ingredientes pueden ser mezclados en un tubo Eppendorf e insertarse en un termociclador (Fig. 1), que permite variar la temperatura de manera automática y programable.<sup>7,33</sup>



Fig.1 Termociclador para reacciones de PCR

La PCR se basa en repetir un número determinado de veces (en la práctica 20 o 30), el fragmento que se ha elegido en lo que se conoce como ciclo. La selección del tiempo, temperatura y número de ciclos depende sobre todo de la cadena de ADN a amplificar y de los primers escogidos.

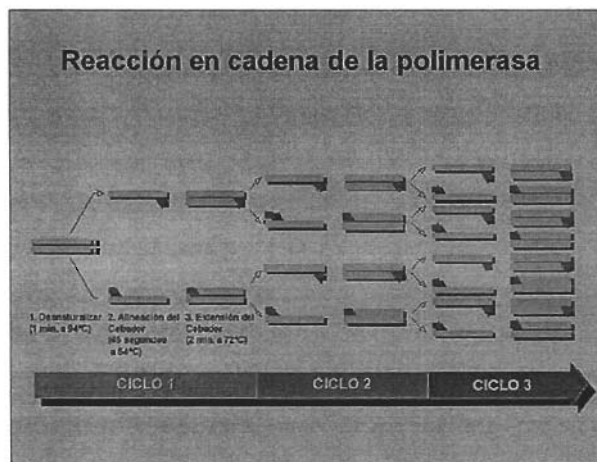
Cada ciclo consta de tres fases:

1.- Desnaturalización: El ciclo 1 comienza al elevar la temperatura hasta que se alcanza la necesaria para la desnaturalización del ADN, éste es capaz de separarse, quedando dos cadenas simples lo que ocurre a 95°C.

2.- Emparejamiento o Annealing: Después de la desnaturalización, la temperatura disminuye a 62-65 °C, las cadenas vuelven a unirse exactamente en el orden en que estaban (principio de complementariedad de bases), si la temperatura se mantiene a esos 62-65°C cualquier fragmento que sea complementario se puede unir: esta circunstancia es

aprovechada para que los primers se unan a sus regiones complementarias, antes de que lo hagan las correspondientes provenientes del ADN original, por la ventaja que les otorga su menor peso molecular.

3.- Extensión: una vez situados los primers en su posición, aumentando la temperatura a 72°C se consigue que la enzima Taq ADN polimerasa comience a actuar, sintetizando una nueva cadena de ADN tomando como molde la que ya existía.



AMGEN BIOTECNOLOGIA PARA LA SALUD

Estos tres pasos componen un solo ciclo de ADN. Inmediatamente comienza el segundo ciclo, con las mismas tres fases, de tal forma que al final de la extensión tendremos 8 cadenas, pues se copian las cuatro que había al final del primer ciclo, al final del tercer ciclo habrá 16 cadenas, 32 después del cuarto, 64 tras el quinto y así sucesivamente, tras repetirse entre 25 y 35 ciclos se consiguen sistemáticamente millones de copias del fragmento de interés seleccionado, en un tiempo de aproximadamente dos a tres horas dependiendo de la cantidad de marcadores que se van a amplificar.<sup>7, 33, 20</sup>

Tras finalizar la amplificación, el termociclador suele programarse para bajar a una temperatura en que ya no haya actividad biológica de la enzima (4°C), con lo que el ADN amplificado queda listo para ser analizado.<sup>7, 33, 20</sup>



**CAPITULO III**  
**ANÁLISIS DEL ADN**

3. Contaminación de indicios.....	23
3.1 Precauciones en la recogida y envío al laboratorio de los indicios.....	26
3.1.1 Indicios biológicos provenientes de el lugar de los hechos.....	28
3.1.2 Muestras provenientes de delitos sexuales.....	32
3.1.3 Muestras provenientes de un occiso.....	33
3.1.4 Muestras provenientes de personas vivas para identificación o análisis de paternidad.....	35
3.2 Extracción del ADN.....	36
3.3 Tipificación.....	38

Para obtener buenos resultados en el análisis del ADN se debe realizar una correcta exploración en el lugar de los hechos, los peritos deben estar capacitados para aplicar los métodos y técnicas para proteger, observar y reconocer un indicio, así como para discriminar y seleccionar solo lo significativo, para su posterior envío y estudio en el laboratorio.<sup>33</sup>

### **3. CONTAMINACIÓN DE INDICIOS**

Para el código penal, el indicio es cualquier vestigio o prueba material de la perpetración de un delito.<sup>33</sup>

Los indicios pueden ser hallados en el lugar de los hechos, en el cuerpo de la víctima o del victimario, en las áreas relacionadas próximas o distantes al lugar de los hechos, éstos son de gran importancia, ya que son una prueba importante para poder impartir justicia, ya sea para incriminar a una persona que se presume inocente, la identificación de la víctima, etc. El indicio es un medio de prueba que contempla la legislación penal moderna.<sup>33</sup>

Dada la importancia de los indicios se debe tener sumo cuidado desde la recogida hasta su transporte al laboratorio y manejo de las muestras dentro del propio laboratorio, se debe de proteger tanto al indicio como al personal. El uso incorrecto de los indicios conduce a su contaminación, deterioro o destrucción, siendo éstas las causas más frecuentes que impiden su posterior análisis en el laboratorio.<sup>33</sup>

Los indicios obtenidos en el lugar de los hechos muchas veces tienen contaminaciones propias, pero algunas otras el personal que recoge el indicio no lo hace de manera adecuada, afectando así la integridad del mismo.<sup>33</sup>

Como la PCR tiene alta sensibilidad una forma en que se puede evitar la contaminación en el laboratorio es dividiendo el laboratorio en secciones ya que si se introduce accidentalmente pequeñas cantidades de ADN también serán amplificadas. Las secciones que se pueden tener en el laboratorio son:

1. **ÁREA DE RECEPCIÓN Y REGISTRO DE MUESTRAS:** En esta área de trabajo son recibidas todas las muestras que ingresarán al laboratorio así como toda la documentación que deberá acompañarlas, aquí son revisadas las condiciones en las que son remitidas las muestras para decidir si dichas muestras se reciben o si

las condiciones no son las adecuadas para su ingreso al laboratorio. Una vez recibidas, se realizará el registro oficial correspondiente al laboratorio, se almacena en un lugar seguro y adecuado para continuar asegurando la cadena de custodia.

2. **ÁREA DE MANEJO DE EVIDENCIA:** Esta área se utiliza para examinar minuciosamente las muestras recibidas, se realiza la fijación fotográfica y se seleccionan las muestras que serán analizadas.
3. **ÁREA DE EXTRACCION DE ADN.** (Apartado 3.6)
4. **ÁREA DEL TERMOCICLADOR PARA REACCIONES DE PCR** (Apartado 2.3)
5. **TIPIFICACIÓN DEL ADN.** (Apartado 3.7)

En todo momento se debe usar, bata, guantes, cubre bocas. Las muestras deben ser analizadas en forma separada. Se deben usar controles positivos y negativos además de un reactivo como blanco, esto es importante para el descubrimiento de contaminantes.<sup>33</sup>

Se pueden contaminar con:

- ❖ **MATERIAL BIOLÓGICO EXÓGENO HUMANO:** Este se debe al depósito de material biológico, en el lugar de los hechos, y/o en el cuerpo de la víctima, antes o después de la comisión del delito, puede ser causada por personas ajenas a la investigación como curiosos o familiares, o por personas involucradas en la investigación como cuerpos de auxilio, o agentes ministeriales.<sup>33</sup>
- ❖ **CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA:** Este tipo de contaminación tiene lugar por el desarrollo de microorganismos y puede estar favorecida por la humedad o la temperatura. Durante la PCR se puede amplificar también el ADN del microorganismo.<sup>33</sup>

- ❖ **CONTAMINACIÓN POR TRANSFERENCIA:** Se debe principalmente al incorrecto embalaje o colecta de muestras y de esta manera transferir material biológico de una muestra a otra.<sup>33</sup>
  
- ❖ **CONTAMINACIÓN QUÍMICA:** Se debe a la presencia de productos químicos que van a dificultar algunos de los procesos del análisis genético, fundamentalmente la extracción y la amplificación de ADN. Se produce fundamentalmente cuando las muestras se envían inmersas en algunos productos conservadores como formol, cuando se realizan estudios previos con sustancias químicas (estudio de huellas dactilares), o cuando las muestras han sido depositadas en sustratos que contienen algún tratamiento químico (algunas telas como la mezclilla), aceites minerales, gasolinas, pinturas. Este tipo de contaminación puede inhibir la reacción de PCR.<sup>33</sup>

### 3.1 PRECAUCIONES EN LA RECOGIDA Y ENVÍO AL LABORATORIO DE LOS INDICIOS

Para cuidar y preservar los indicios se debe de:

- 1) Asegurar el lugar de los hechos
  - ✓ Llegar con rapidez
  - ✓ No mover ni tocar nada
  - ✓ Seleccionar el área por donde se vaya a observar el lugar
  
- 2) Fotografiar el lugar de los hechos
  
- 3) Buscar detenidamente los indicios
  
- 4) Tomar grandes acercamientos del indicio
  
- 5) Levantar y etiquetar el indicio lo más pronto posible
  
- 6) Embalar el indicio
  
- 7) Registrar por escrito todo lo relacionado con el indicio
  
- 8) Sellar el lugar de los hechos al terminar.
  
- 9) Entregar el indicio al laboratorio, guardando siempre la cadena de custodia.
  
- 10) Resguardar el indicio en un lugar seguro y adecuado.<sup>33</sup>

Durante la colecta, embalaje y envío, los indicios deben protegerse de la contaminación, ya que cualquier material proveniente del manipulador, puede imposibilitar su posterior análisis. En este sentido deben seguirse las siguientes normas generales:

- 1.- Procurar las máximas condiciones de esterilidad, usando todos los materiales requeridos estériles y desechables.
- 2.- Utilizar instrumentos diferentes para coleccionar indicios diferentes, cambiando constantemente los guantes.
- 3.- Utilizar recipientes diferentes para cada indicio, aun cuando hayan sido localizados en lugares muy próximos.
- 4.- Si para el envío se usan sobres, estos no deberán ser cerrados
- 5.-Etiquetar perfecta e inmediatamente todos los indicios, haciendo referencia al menos de: fecha, hora, localización y tipo de indicio, nombre de quien tomó la muestra.
- 6.- Enviar lo más rápido posible al laboratorio, asegurando que las muestra que requieran refrigeración, se transporten en condiciones adecuadas.
- 7.- Es fundamental tomar muestras testigo de la víctima y/o sospechoso (sangre, siempre con la autorización de la persona implicada).<sup>33</sup>

### 3.1.1 INDICIOS BIOLÓGICOS PROVENIENTES DE EL LUGAR DE LOS HECHOS:

- **Sangre:** Es el indicio biológico más habitual de los indicios encontrados en el lugar de los hechos, es la muestra más fácil de trabajar y es la que se prefiere si es que se tiene la opción de elegir. En la misma, el ADN se extrae de los glóbulos blancos (que son células con núcleo), que existen aproximadamente de 5000-10000 por mililitro, por lo que una mancha, por pequeña que parezca, puede contener material suficiente para aplicar técnicas de amplificación (PCR) y así poder identificar a la persona de la que proviene esa muestra.<sup>33</sup>
- **Manchas De Sangre**
  - a) **MANCHAS DE SANGRE SOBRE OBJETOS TRANSPORTABLES:** se consideran aquellos objetos que puedan ser transportables como prendas, zapatos, armas, piedras, envases, etc.
    - si las manchas se encuentra húmedas, dejar secar sin exponer al sol y embalar en sobres de papel.
    - si se trata de manchas sobre ropa, embalar por separado en bolsas de papel.Quando se trate de manchas sobre soportes que puedan ser recortados como cortinas o alfombras, recortar la mancha y embalarla en bolsas de papel.
  - b) **MANCHAS DE SANGRE SOBRE OBJETOS NO TRANSPORTABLES:** Pisos, paredes, muebles u otros.
    - si la mancha se encuentra seca y puede rasparse, utilizar una navaja de bisturí y recibir el raspado directamente sobre una hoja o bolsa de papel.
    - si la mancha no puede ser raspada, humedecer un hisopo, tela o papel FTA con solución salina, colocarlo sobre la mancha hasta que se impregne de la misma, dejar

secar el soporte y embalar en una hoja de papel y etiquetar con todos los datos del caso.

- Sangre líquida: Se debe tomar con una jeringa, pipeta o bulbo estéril y colocarla en un tubo con EDTA, etiquetar con todos los datos del caso, conservar y transportar al laboratorio a temperaturas de refrigeración.
  - Coágulos de sangre: Deben levantarse con aplicadores de plástico, de madera o espátula y colocarlos en tubo de ensaye estéril, etiquetar con todos los datos del caso y transportar al laboratorio e temperaturas de refrigeración.
  - Sangre de cadáver: La sangre se toma en recipientes estériles de las partes internas del cadáver (cráneo, corazón) ya que son las menos expuestas, etiquetar con todos los datos del caso y transportar al laboratorio a temperatura de refrigeración.<sup>33</sup>
- Saliva:
    - Saliva sobre piel: Es importante realizar una búsqueda de saliva sobre la víctima proveniente del agresor, en posibles mordeduras o sobre regiones típicas como el cuello o los senos. para este tipo de muestras se humedece un hisopo con solución salina y se desliza de manera circular sobre las zonas que se sospeche existe algún resto de saliva, no frotando demasiado para evitar levantar células de la propia víctima.
    - Saliva en objetos transportables (colillas de cigarro, vasos, etc.): Se coloca el objeto individualmente dentro de un sobre de papel, evitando manipular la zona donde se sospeche existe la muestra, en el caso de colillas del cigarrillo, tomar con pinzas por la parte media y colocar de manera individual en bolsas de plástico, evitando contaminar la muestra con la ceniza.



- Saliva en objetos no transportables: se humedece un hisopo con solución salina estéril y se frota la mancha para depositarla en el hisopo, se deja secar y se coloca en un sobre de papel.<sup>33</sup>
- Semen: En este tipo de muestras es fundamental enumerar los hisopos, para comenzar los análisis por el hisopo que haya sido tomado en primer lugar.
  - Semen líquido: La muestra se toma aspirando con una pipeta de transferencia y se coloca en un tubo eppendorf estéril, la muestra debe ser transportada en condiciones de refrigeración, alternatively la muestra se fija en coloca sobre un papel FTA se deja secar, y se coloca en un sobre de papel.
  - Semen sobre piel: Se humedece un hisopo con solución salina estéril y se desliza el hisopo de manera circular sobre el fragmento de piel en donde se encuentra la mancha de semen, sin presionar sobre la superficie para evitar levantar células que provengan de la piel y solamente extraer las células de la mancha de semen.
  - Manchas de semen: De igual manera se humedece un hisopo con solución salina estéril y se desliza de manera circular sobre la superficie que se sospecha existe una mancha de semen, se deja secar el hisopo y se embala en un sobre de papel.
  - Semen en las ropas de la víctima: Deberá hacerse una revisión minuciosa de las ropas que vestía la víctima, con la finalidad de localizar posibles manchas de semen que pudieran existir, este tipo de muestras se toman recortando el fragmento de la prenda que se sospeche

tiene una mancha de semen, se embala en un sobre de papel.<sup>33</sup>

- Elementos pilosos: Estos pueden ser cabello, ceja, bigote, vello púbico y de axila, todos estos elementos pueden ser susceptibles de tipificación genética a través de un análisis de ADN nuclear siempre y cuando presenten raíz en fase de crecimiento activo. En caso de no presentar raíz o que ésta no se encuentre en fase de crecimiento activo, puede ser susceptible de análisis por secuenciación de ADN mitocondrial. Para el levantamiento de este tipo de indicio se deberá tomar cada elemento piloso, por su parte media y embalar por separado en una bolsa o sobre de papel, cambiar las pinzas o esterilizarlas a la flama cada vez que se levante un indicio.<sup>33</sup>
- Tejidos: Este tipo de muestras se toman con pinzas estériles una porción de aproximadamente 5 g de las muestras mejor conservadas eligiendo hígado, pulmón, corazón, músculo, colocando cada porción de manera individual en un recipiente estéril y enviar al laboratorio en condiciones de refrigeración.<sup>33</sup>

### 3.1.2 MUESTRAS PROVENIENTES DE DELITOS SEXUALES:

Las muestras obtenidas en este tipo de delitos generalmente son saliva y semen. Procedimiento que se explica en el apartado 3.1.

- Exudado vaginal: Se impregna tres hisopos con solución salina estéril, frotar con cada hisopo, la parte externa, las paredes y fondo de la vagina.
- Exudado anal: Se impregnan dos hisopos con solución salina estéril, se frota la región anal y perianal.
- Exudado balano prepucial: Se impregna dos hisopos con solución salina estéril y se frota la región balano prepucial.
- Exudado oral: Se humedecen con solución salina dos hisopos estériles y se desliza en la cavidad bucal principalmente entre las piezas dentales y el carrillo, rotando el aplicador para que se impregne en toda su superficie.

Todas las muestras anteriores se dejan secar y se embalan en un sobre de papel o en un tubo de ensaye estéril.<sup>33</sup>

### 3.1.3 MUESTRAS PROVENIENTES DE UN OCCISO

- EN BUEN ESTADO DE CONSERVACIÓN.
  - SANGRE.- siempre y cuando las circunstancias lo permitan, la muestra que se prefiere obtener de un cadáver es sangre, la cual se toma en un tubo de ensaye estéril y durante la necroscopia.<sup>33</sup>
  - MÚSCULO ESQUELÉTICO.- se selecciona un fragmento de 5 gr de músculo esquelético de la zona mejor conservada, se introduce en un recipiente de plástico y se conserva en refrigeración si no se trabajará inmediatamente.<sup>33</sup>
  
- AVANZADO ESTADO DE PUTREFACCIÓN
  - HUESOS.- siempre que sea posible seleccionar huesos largos y preferentemente fémur, colocar todas las muestras elegidas en sobres de papel y de manera individual.<sup>33</sup>
  - DIENTES.- En el caso de dientes, seleccionar al menos cuatro piezas dentales, si es posible molares, que no presenten daños extremos y que no hayan sido sometidas a endodoncia.<sup>33</sup>
  
- TEJIDOS DE CADÁVERES QUEMADOS PARCIALMENTE: A pesar de lo que la apariencia externa pueda indicar, la estabilidad de ADN a altas temperaturas permite que, en cadáveres en los que la carbonización no es total, el análisis se pueda realizar en fragmentos de músculo esquelético de zonas profundas. Este tipo de muestras se toman con un bisturí y pinzas estériles, las porciones del tejido deben estar lo mejor conservadas y lo más cercano al hueso. Cada porción se coloca de manera individual en recipientes estériles.

Si lo anterior ya no es posible se tendrá que elegir algún tipo de muestra aún conservada, como huesos largos (fémur, húmero, costilla).<sup>33</sup>

### 3.1.4 MUESTRAS PROVENIENTES DE PERSONAS VIVAS PARA IDENTIFICACION O ANALISIS DE PATERNIDAD.

Para el caso de personas vivas, con fines de identificación o análisis de paternidad, la muestra que preferentemente se toma, es sangre, siempre y cuando no existan situaciones que pudieran interferir en el análisis, por ejemplo, personas que hayan sido transfundidas o que hayan recibido un trasplante de médula ósea, en cuyo caso la muestra que se toma es de saliva o cabello.<sup>33</sup>

- PUNCIÓN VENOSA.- se toman unos 3 mL de sangre que se depositan en un tubo que contenga un anticoagulante EDTA.
- PUNCIÓN DACTILAR.- con una lanceta quirúrgica se pincha la cara anterior de algún dedo de la mano y las gotas de sangre obtenidas se depositan en un tubo con anticoagulante (EDTA) o se fijan 3-4 gotas sobre un papel tipo FTA.
- SALIVA LÍQUIDA.- se le pide a la persona que deposite un poco de saliva en tubo eppendorf estéril y se le coloca la misma cantidad de alcohol para su conservación.
- RASPADO BUCAL.- se realiza frotando la parte interna de los carrillos con un hisopo, un palillo de madera o un citocepillo. Con un citocepillo se frota la cara interna del carrillo izquierdo y con otro la cara interna del carrillo derecho, se dejan secar y se introducen en un sobre de papel o bien se introducen en un tubo eppendorf estéril.
- CABELLO.- para este tipo de muestras se arrancan de 10-15 cabellos con raíz y se introducen en una bolsa de plástico.<sup>33</sup>

### 3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN

El éxito del análisis de ADN se fundamenta en la extracción de un ADN en cantidad, calidad y pureza suficiente. Dependiendo del tipo de procedimiento, la cantidad y la calidad pueden variar ampliamente.<sup>33</sup>

De modo ideal, los protocolos de extracción deben ser sencillos y baratos. Paralelamente, deben ser aptos para poder extraer ADN de pequeñas gotas y manchas de sangre y de otros tejidos. Las técnicas a utilizar son:

- **TÉCNICA DE EXTRACCIÓN ORGÁNICA.** Se basa en la digestión proteínica de las membranas celulares y la separación del ADN por gradientes de solubilidad en una extracción líquido-líquido.
- **TÉCNICA DE EXTRACCIÓN INORGÁNICA.** Generalmente están basadas en el uso de resinas quelantes con carga negativa, que tienen afinidad por iones metálicos polivalentes. Contienen grupos que actúan como grupos quelantes.
- **TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DE KITS COMERCIALES ADN -IQ.** Esta basada en la afinidad eléctrica del ADN (carga negativa), mediante una resina magnética (carga positiva), para formar un complejo (resina-ADN) y con la ayuda de una barra imantada se hace posible la extracción del ADN.<sup>33</sup>

El método de elección en la extracción de ADN, es, el orgánico. Aunque el protocolo de trabajo exige mayor tiempo y más trabajo, al final la pureza del ADN extraído es mayor que el que se consigue con otros métodos. Por ello se eliminan mayor cantidad de proteínas, cuando se usan filtros específicos, también se remueven inhibidores enzimáticos.<sup>33</sup>

El ADN obtenido debe cubrir ciertas características como son:

- Cantidad de ADN ( 10ng)
- Calidad del ADN (longitud de las moléculas del ADN)
- Pureza ( limpieza del material genético)

Una vez que se obtiene el ADN se procede a amplificarlo por PCR según el apartado 2.3.<sup>33</sup>



### 3.3 TIPIFICACIÓN

En los 90's en el área forense, después que las muestras habían sido simplificadas por PCR, la tipificación se podía llevar a cabo por:

1) **DOT-BLOT:** Fue el primer método utilizado en el análisis forense, después de la amplificación por PCR. En esta técnica se utilizan oligonucleótidos específicos de alelos ( en ingles allele specific oligonucleotides, ASO), en forma de dot-blot. En condiciones apropiadas, las sondas tipo ASO se unen sólo a aquellas secuencias de ADN que contienen su exacta secuencia complementaria. Por ello para cada alelo a determinar en un locus hace falta una sonda complementaria. En esta técnica, una batería de sondas ASO se fijan a una membrana de nylon en forma alargada o de tira; una tira puede albergar sondas de diferentes alelos de varios loci. Las regiones correspondientes de ADN, una vez amplificadas, se unen a sus sondas complementarias. Para facilitar la identificación, se une una molécula marcada al extremo 5' del primer de amplificación, de tal modo que cuando el ADN amplificado está unido a la sonda, se puede proceder a la visualización.<sup>18</sup>

El locus de HLA-DQA1 ha sido uno de los más caracterizados de todos los análisis forenses basados en PCR y posterior dot-blot. El sistema de PCR estaba basado en el formato dot blot a la inversa para el análisis de especímenes forenses. La molécula de HLA-DQ es un heterodímero compuesto de una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Se expresa en los linfocitos B, macrófagos, epitelio del timo y las células T activadas. HLA-DQ es una región que codifica diferentes proteínas de membrana integral para acoplamiento, así como para presentar fragmentos antigénicos peptídicos a los receptores de células T de los linfocitos T CD4+.<sup>18, 20</sup>

El polimorfismo que determina los alelos del locus HLA-DQA1 se detecta por amplificación de un fragmento de 242 pares de bases (o de 2329 pares de bases para los alelos 2 y 4), del segundo exón del gen del HLA-DQ alfa y posterior hibridación a una tira específica. Se han identificado 8 alelos comunes, conocidos como 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 4.1, 4.2, y 4.3. Hay cuatro sondas para determinar los alelos 1, 2, 3 y 4; el alelo 1 puede ser subtipado como alelo 1.1, 1.2, y 1.3; el alelo

4 puede ser subtipado como 4.1 ó 4.2/4.3. Todas las sondas necesarias para detectar estos alelos están en una sola tira. El marcador molecular unido a uno de los extremos 5' de uno de los dos primers de cada locus es biotina. Inmediatamente después de la hibridación, un complejo de estreptovidina-peroxidasa es puesto en contacto con la biotina, con lo que se oxida el sustrato tetra-metil-bencidina, resultando en un precipitado de color azul en el lugar de hibridación, que pone de manifiesto la presencia de un alelo determinado.<sup>18, 20</sup>

Aunque es posible analizar cantidades de ADN muy pequeñas con el locus HLA-DQA1, los datos de un solo locus no alcanzan el poder de discriminación que se consigue con el análisis de los loci tipo VNTR por medio de la técnica de RFLP. Para incrementar el poder de discriminación de los loci basados en el análisis por PCR, el kit AmpliType® PM+DQA1 ( PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA), permite la amplificación simultánea o múltiple del locus HLA-DQA1 y de otros cinco marcadores genéticos, los cuales son el receptor de lipoproteínas de baja densidad /LDLR: low density lipoprotein receptor), la glicoforina a (GYPA: glycophorin A), la hemoglobina G gammaglobulina (HBGG: hemoglobin G gammaglobulin), el D7S8 y el componente específico de grupo (Gc:group specific component). Los cinco loci anteriores, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y Gc, componen el kit Poly-Marker® o PM, y son analizados simultáneamente por medio de técnicas de ASO y dot-blot reverso, al igual que lo es el HLA-DQA1. Con éste kit, los loci LDLR, GYPA, y D7S8 muestran dos alelos, mientras que los loci HBGG y Gc muestran tres. Además de las ventajas generales de la PCR, un sistema o kit múltiple como el DQA1 + PM muestran las siguientes ventajas:

- 1) Es necesario usar menos muestra de indicios que cuando se analizan los loci individualmente o por separado.
- 2) Se obtiene más información de un solo análisis.
- 3) Se reduce el trabajo.

- 4) Al haber menos manipulaciones, se reducen las posibilidades de contaminación cruzada o se confusión de muestras por el personal del laboratorio.<sup>18, 20</sup>

**2) ELECTROFORESIS EN GEL:** Separación por electroforesis en gel de agarosa y poliacrilamida, basado en el tamaño del polimorfismo.<sup>18, 20</sup>

- **VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS (VNTR)**

Los VNTRs o minisatélites, estos tienen unidades de repeticiones de 2 a 80 bp de longitud, son el marcador genético que proporciona más información, ya que intenta individualizar al material biológico. El tamaño del fragmento amplificado (o alelo) es establecido por el número y tamaño de la secuencia de repeticiones. Encontrando los loci apropiados de VNTR y con un sistema de electroforesis de alta resolución la amplificación por PCR es específica para secuencias VNTR, por lo cual se considero su uso en la identificación humana en el área forense.<sup>18, 20</sup>

Los productos obtenidos de la amplificación por PCR, se pueden separar en geles de agarosa con una posterior tinción con bromuro de etidio, o la secuenciación en gel de poliacrilamida con detección isotópica como informo Allen et al. y Budowle et al. El sistema de detección se puede realizar con la incorporación de radioisótopos dentro del producto de amplificación o por hibridación en sonda del sitio específico. Si se utiliza este método se debe considerar que el bromuro de etidio y los radioisótopos son material peligroso, con lo que se requiere un manejo especial.<sup>18, 20</sup>

- **SHORT TANDEM REPEAT (STR)**

Los STR's, o 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 (tetranucleotidos) y es la técnica de análisis de ADN más frecuentemente usada; estos microsatélites son abundantes en el genoma humano y son muy polimorficos. Como la región que tiene las repeticiones en tandem es muy

pequeña, se puede amplificar fácilmente por PCR. Usando la PCR, los SRTs pueden ser analizados con un alto grado de sensibilidad, especificidad y con un alto grado de discriminación, en un periodo de tiempo relativamente corto.<sup>18, 20</sup>

En la actualidad las técnicas de PCR múltiplex permiten el análisis simultáneo de hasta 16 loci tipo STR.<sup>18, 20</sup>

El análisis del perfil de ADN mediante la técnica de STR se lleva a cabo separando los fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida, con posterior detección de los productos cuando se han terminado de separar. Cada locus STR produce una banda o pico (homocigoto) o dos (heterocigoto) por persona. Los perfiles se comparan; los perfiles de varios loci STR analizados simultáneamente pueden llegar a ser muy discriminativos (fig.1).<sup>18, 20</sup>

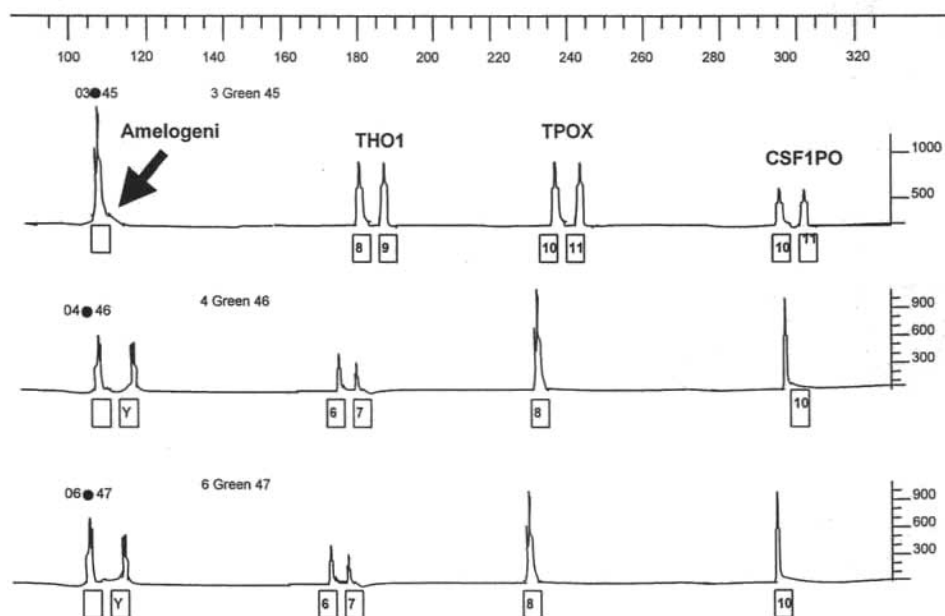


Fig.1. Análisis de loci STR en un caso de violación. El análisis del perfil del ADN fue hecho usando detección fluorescente. Por ello aparecen picos en lugar de bandas. Hay presentes datos de 3 loci STR: CSF1PO, TPOX y THO1, así como de locus amelogenina, para determinar el sexo del donante de la muestra. El perfil más alto es de una muestra de referencia de la víctima (una mujer). El perfil del centro es una muestra de referencia del sospechoso (un hombre): El perfil

inferior es de una mancha de ADN. La nomenclatura, en forma de números de los alelos está debajo de cada pico. El sospechoso y el indicio tienen idénticos perfiles en los STRs y en la amelogenina. En consecuencia, el sospechoso no puede ser excluido como donante potencial de la muestra.<sup>18, 20</sup>

Hochmeister et al, describieron el uso del loci STR para identificar los restos del cadáver de una persona que apareció en una zona boscosa un año después de su desaparición. La identificación de una mujer de 56 años de edad, que había desaparecido un año antes, fue establecida provisionalmente usando rayos X, ficha dental y datos circunstanciales. El ADN fue extraído de un fragmento de fémur y se analizaron varios loci STR. El resultado se comparó con un ADN de referencia obtenido de los cabellos que había en un cepillo del pelo recuperado del apartamento de la desaparecida. Pese a que no se pudieron hacer análisis con RFLP porque la cantidad de ADN de la evidencia era muy pequeña, se consiguieron analizar 9 loci por PCR ( de tipo STR, el HLA-DQA1 y los 5 del Polymarker). Los perfiles obtenidos en el hueso y en los cabellos para estos 9 loci fueron los mismos, y dieron un genotipo conjunto que sólo lo presentan 1 de cada 1.1 millón de mujeres. De este modo, el ADN aportó al caso particular una fuerte evidencia a favor de la identificación.<sup>18, 20</sup>

### 3) DIRECTAMENTE LA SECUENCIACIÓN DE EL PRODUCTO DE LA

**PCR:** La secuenciación directa puede proporcionar con más detalle la información del segmento del ADN obtenido por la amplificación en PCR. La PCR crea un patrón suficiente para la secuenciación y así se elimina la necesidad de clonar.<sup>18, 20</sup>

Gyllensten y Erlich propusieron el PCR asimétrico, en el cual uno de los primers es limitado durante la PCR, o por una biotinización de uno de los primers tal que una hebra del producto de amplificación se pueda aislar, ya sea magnéticamente o con bolitas de poliestireno. La secuenciación se hace con una polimerasa termoestable, que repite el ciclo de extensión y desnaturalización resultando en una acumulación lineal de los productos de PCR, incrementándose la sensibilidad de la reacción de secuencia, reportado por Lee, Ruano y Kidd en 1991.<sup>18, 20</sup>

La secuenciación de la terminación de la cadena se lleva a cabo con primers marcados (generalmente radioactivo o fluorescente). El dNTPS marcado, o la terminación diodeoxinucleotido marcada, método sugerido por Sanger, et al. La secuenciación no era considerada como una alternativa para la identificación de la variación genética con propósitos forenses hasta que se proporcionó el análisis automatizado de fluorescencia, lo que hizo posible marcar las secuencias. Los productos de reacción de secuencia pueden ser separados con geles de poliacrilamida, en un tiempo real, con un secuenciador de ADN automático, interpretando de esta manera la secuencia. Se elimina la necesidad de la radioactividad, porque se utilizan diferentes tintes fluorescentes en cada reacción de terminación de cadena, y también permite un análisis completo que se puede correr en un carril en lugar de 4 carriles, como generalmente se hace con la secuenciación de Sanger convencional.<sup>18, 20</sup>

Esta determinación se dificulta cuando en la muestra a analizar hay una mezcla de fluidos biológicos, evidencias asociados a crímenes violentos. Por lo que Cerril, sugirió que el ADN mitocondrial (**ADNmt**) podría servir como marcador genético en cierto material evidenciarlo. El ADN nuclear está estrechamente asociado con

proteínas y repartido en cromosomas, en cambio el ADNmt, se asemeja al ADN bacteriano en su forma de doble hélice circular.<sup>18, 20</sup>

El ADNmt es un modelo de economía ya que sus genes están tan empaquetados que la mayor parte de los aproximadamente 16569 pares de bases (pb) que lo componen parecen tener alguna utilidad. La región codificante contiene 37 genes, de los cuales 22 son para ARN de transferencia, 2 para ARN ribosómico y 13 para proteínas envueltas en la fosforilación oxidativa y en la producción de ATP.<sup>18, 20</sup>

Las dos hebras complementarias o cadenas del ADNmt tienen diferencias significativas en la composición de las bases que conforman sus nucleótidos de manera que se denomina *cadena pesada o H (Heavy)*, a aquella que es rica en bases púricas y *cadena ligera o L (Ligth)* a la que por el contrario posee un número mayor de bases pirimídicas. Además de la región codificante, hay una región no codificante denominada *región control* y debido a las estructuras visibles bajo microscopia electrónica durante la replicación también es llamada asa de desdoblamiento (D-OLP).<sup>18, 20</sup>

El ADNmt tiene una serie de características que suponen una gran ventaja y que hacen de él una fuente de información importante en multitud de áreas de estudio. Estas características son:

1. Herencia materna: La secuencia de una determinada molécula de ADNmt es llamada haplotipo, ya que el genoma mitocondrial es haploide, esto es debido a que en humanos, la herencia es estrictamente uniparental materna. Esto quiere decir, que salvo mutación, el ADNmt de hermanos, de hijo y madre y en general de aquellos individuos relacionados por vía materna es idéntico.
2. Alto número de copias: Aunque el ADNmt contiene mucho menos información que el ADN nuclear, en cambio, tiene muchas mas copias por célula. Por término medio se estima que hay de 10-100 mitocondrias por célula y de 100-1000 copias de ADNmt por célula.

3. Alta tasa de mutación y heteroplasmia: Tiene una tasa de mutación de 5-10 veces mayor que el ADN nuclear.

La heteroplasmia se puede dividir en:

- Heteroplasmia se secuencia; la cual ocurre cuando en una posición determinada de la secuencia del ADNmt hay más de una base, por ejemplo la existencia de C/T.
- Heteroplasmia de longitud; que se manifiesta como la variación en el número de bases existentes en un fragmento homopolimérico, por ejemplo es característica la variación en el número de C's en el fragmento de poliC en HV2. Así, en un mismo individuo, pueden coexistir poblaciones de ADNmt las cuales difieren en el número de citosinas dentro de esos fragmentos.<sup>18, 20</sup>

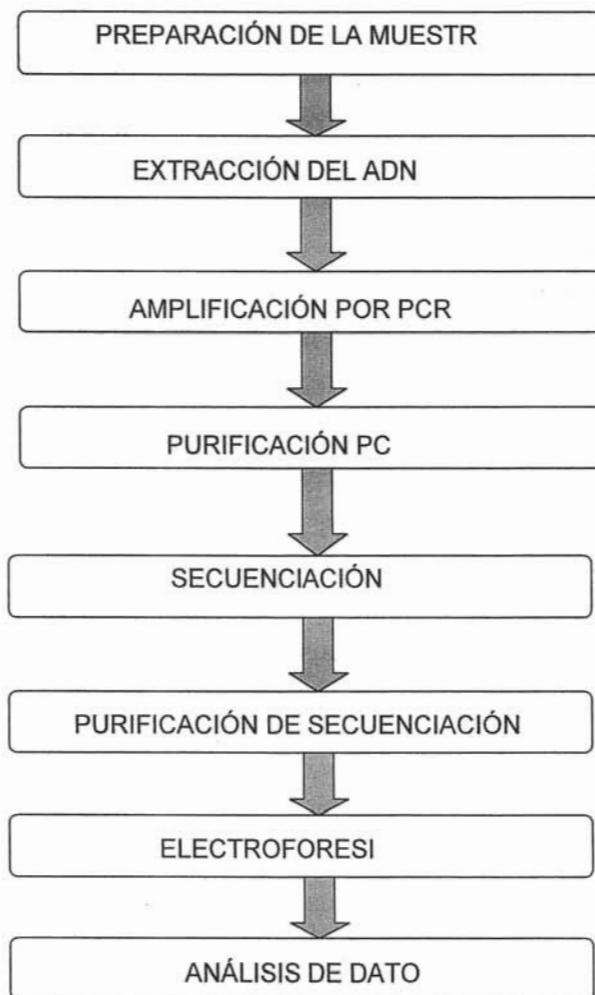
A pesar de la mayor información que puede aportar el estudio del ADN nuclear, en ocasiones su análisis es imposible cuando la muestra de la que se dispone es insuficiente o tiene excesiva degradación. En estos casos cuando el ADNmt puede desplegar todo su potencial. Por lo tanto, las muestras más idóneas para aplicar el análisis por ADNmt son aquellas que están en cantidad mínima y/o degradada, destacando:

- Pelos sin bulbo: Un vestigio bastante común en pericia forense y de hecho es posible obtener resultados a partir de una muestra tan pequeña como 1-2 cm de pelo carente de raíz.
- Muestras muy degradadas: como por ejemplo restos óseos antiguos. La estructura circular de la molécula de ADNmt hace que sea menos susceptible a la degradación por exonucleasas.



- Análisis de restos de personas desaparecidas: Donde los familiares relacionados por vía materna (incluso ascendientes o descendientes separados por alguna generación) puede suministrar muestras de referencia que puedan compararse y verificar la identidad de los restos analizados.<sup>20, 24</sup>

El esquema básico del proceso analítico sería el siguiente<sup>24</sup>:



Una vez analizadas las muestras en el equipo, es necesario ver los resultados obtenidos bajo el software Sequence Navigator (como ejemplo), que permite no solo editar la secuencia, si no también comparar la secuencia de referencia (secuencia de Anerson), para mostrar las diferencias existentes.<sup>24</sup>

Capítulo IV  
PCR EN EL ÁMBITO LEGAL

4. Validaciones.....49

4.1 Casos Forenses

4.1.1 Extracción de inhibidores de la PCR y  
la tipificación de ADN por STR en una  
mezcla de sangre humana y canina. ....51

4.1.2 ADN mitocondrial y tipificación por STR de  
material adherido a un celular.....53.

4.1.3 Identificación de restos esqueléticos  
presumiblemente sumergidos en agua durante  
tres años por PCR-STR.....54

4.1.4 La historia Abraham, Isaac y Jacob.....56

#### 4. VALIDACIONES

En los últimos años se han realizado validaciones tanto de la amplificación de PCR como del STR <sup>7,8</sup>. En el 2001 Tamyra R. Moretti, et al., realizó una validación del STR en el área forense. Comenta que la amplificación con PCR Múltiples y la tipificación con STR proporcionan sensibilidad, alta discriminación y una rápida caracterización de los especímenes forenses. En su estudio seleccionó trece loci STR, los cuales se tomaron de E.U. Los loci escogidos son:

CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, y D21S11. Estos loci pueden ser analizados usando una combinación de dos o más de los siguientes Kits fluorescentes en la amplificación Múltiples: AmpF $\phi$ STR<sup>®</sup> Profiles<sup>™</sup>, Profiles Plus<sup>™</sup>, COfiler<sup>™</sup>, Blue, and Green 1 (aplicado a biositem, Foster city, CA); GenePrint<sup>™</sup> PowerPrint<sup>™</sup> y CTV. Adicionalmente, el locus de amelogenina para la identificación del sexo se incluyeron algunos otros kits. Para la detección de sistemas simples y multifluoroforos, Prism ABI<sup>®</sup> 310 como analizador genético, el ABI Prism 373 y 377 secuenciador de ADN, el Láser fluorescente automático (A.L.F) secuenciador de ADN <sup>™</sup>, el FMBIO<sup>®</sup> II dispositivo de imagen fluorescente, y el FluorImager los cuales pueden ser usado ampliamente. <sup>18, 20</sup>

El estudio de Tamyra R. Moretti, et al., fue para la evaluación de las características de rendimiento de los Kits STR. La reproducibilidad y consistencia de los resultados se demostraron con muestras de casos tipificados con anterioridad., muestras medioambientalmente dañadas y fluidos corporales depositados sobre varios sustratos. También se evaluó la habilidad de detectar los componentes de las muestras que contiene mezclas de ADN. <sup>18, 20</sup>

Los autores llegaron a la conclusión de que los equipos disponibles comercialmente Múltiple: AmpF $\phi$ STR<sup>®</sup> Profiles<sup>™</sup>, Profiles Plus<sup>™</sup>, COfiler<sup>™</sup>, Blue, and Green 1, GenePrint<sup>™</sup> PowerPrint<sup>™</sup>, pueden ser usados para amplificar y tipificar los loci de STR con éxito, en los especímenes biológicos humanos. El análisis de las muestras demostraron que los procesos de tipificación de los loci de STR, son confiables. No se obtuvieron falsos positivos o falsos negativos. Además se demostró que se pueden tipificar con éxito muestras que contienen

cantidades pequeñas de ADN, así como muestras que contienen ADN un poco degradado.<sup>18, 20</sup>

En la actualidad en los laboratorios forenses se está utilizando la electroforesis capilar, como una alternativa de la electroforesis común, ya que con éste último método se consume más tiempo, además de que es tedioso y laborioso. Después de la amplificación un instrumento utilizado para la electroforesis capilar es el ABI Prism® 310 analizador genético, es semiautomático, además de que cuenta con un mecanismo robótico que permite la inyección de 96 muestras, también cuenta con una computadora. Los fragmentos amplificados están separados dentro de un capilar de diámetro pequeño, el cual tiene un medio acuoso. Cada muestra está separada por un polímero que se bombea automáticamente dentro del capilar. En este aparato los fragmentos amplificados marcados con fluorescencia se detectan por la inducción de un láser que induce fluorescencia (LIF), éste atraviesa las moléculas, emitiendo a una longitud de 525 a 680 nm. La sensibilidad y la especificidad del LIF hace que esta técnica se prefiera para la detección de ADN. Los capilares se pueden utilizar para el análisis de muestras a temperaturas altas (60° aprox.), así como un campo de alta intensidad, con un aumento en la resolución y sin dañar la matriz. La computadora proporciona ayuda en el análisis de los resultados, ya que estima el tamaño de los fragmentos del ADN y designa los alelos de los loci de los STR.

Varios factores intervienen en la eficacia, sensibilidad, resolución, y precisión de la separación de los alelos del STR. Estos incluyen: Tipo y concentración del polímero, temperatura del ambiente capilar, la magnitud del campo eléctrico que se aplicó durante la inyección y separación de la muestra, la concentración de la sal, el volumen inyectado de la muestra y la longitud del capilar.<sup>9,11,18,20,25,50</sup>

## 4.1 CASOS FORENSES

### 4.1.1 EXTRACCIÓN DE INHIBIDORES DE LA PCR Y LA TIPIFICACIÓN DE ADN POR STR EN UNA MEZCLA DE SANGRE HUMANA Y CANINA.

La amplificación por PCR en combinación con STR, ha sido de gran ayuda para resolver casos con indicios biológicos humanos y diferenciarlos de los animales.<sup>16</sup>

Un ejemplo es el caso de un hombre de 68 años que se encontró muerto en su residencia de Vernon, Columbia Británica en 1991. El perro terrier de la víctima, también se encontró muerto dentro del cobertizo del traspatio. El hombre y su perro, tenían heridas fatales en la cabeza. Se recuperaron las muestras de sangre de la víctima y del perro, para posteriores comparaciones, en el análisis del ADN. Las pruebas que se colectaron fueron un par de pantalones vaqueros y un suéter del sospechoso. Se identificaron cantidades pequeñas en el suéter y en cuatro áreas de los pantalones vaqueros.<sup>16</sup>

En 1992, después de la extracción orgánica, el ADN se determinó por hibridación, en donde se utilizaban sondas D17Z1, haciendo el análisis con bromuro de etidio y la electroforesis en gel de agarosa. De esta manera se comprobó la presencia de ADN humano en el suéter y en el pantalón, y ADN del perro en el pantalón. Sin embargo, como había una cantidad insuficiente para el análisis RFLP-VNTR, el ADN fue guardado, hasta que la tecnología hizo disponible la amplificación y tipificación del ADN.<sup>16</sup>

En 1996, el caso se reabrió, y esta vez el análisis se realizó por PCR-STR. Se obtuvieron los perfiles de ADN de la sangre que se encontraba en el suéter de los sospechosos. Sin embargo, no se pudo obtener el perfil del ADN en los pantalones vaqueros. Como esta evidencia era importante, se decidió buscar un método para resolver el problema. En este análisis se planteó que podría haber algún inhibidor en los pantalones vaqueros. Se utilizó con éxito para remover los inhibidores de la PCR, tiopropil sefarosa, pudiendo así amplificar y tipificar la muestra. Se analizaron 4 loci de STR humano y 11 loci de STR canino. Al obtener la combinación de esta evidencia y el perfil del ADN del suéter, dio resolución a este caso en la suprema corte de Columbia Británica.<sup>16</sup>

#### 4.1.2 ADN MITOCONDRIAL Y TIPIFICACIÓN POR STR DE MATERIAL ADHERIDO AL AURICULAR.

En junio del 2000 se intentó robar un banco en la ciudad de Mayazaky, Japón. Aunque el ladrón (presumiblemente de unos 30-50 años), quien traía una máscara y una pistola, huyó sin lograr consumar el robo ya que una persona que laboraba en el banco contraatacó al ladrón. Unos días después, se encontró en un callejón una patineta de motor y una máscara que se usaron en el robo. Había también un celular dentro de la máscara que perteneció al sospechoso. Como consecuencia, en este estudio se trató de analizar el material que había quedado adherido al auricular. Yasuhisa, et al., utilizó como controles para este análisis, celulares que se habían utilizado por más de un mes, se utilizó sangre o células bucales obtenidas de cinco voluntarios (tres varones y dos mujeres), y el cerumen de dos sujetos (un varón y una mujer), estos se tipificaron húmedos y los primeros secos. En este caso no sólo se analizaron las muestras, sino se compararon los métodos de tipificación STR y la secuenciación directa del ADN mitocondrial.

Se amplificaron seis loci los cuales se analizaron por STR, en donde no se obtuvieron buenos resultados ya que el ADN se encontraba degradado. Por lo anterior se procedió a secuenciar el ADNmt, obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra de origen	Posición de mutación									
	HV-I					HV-II				
	1	1	1	1	7	1	2	2	3	3
	6	6	6	6	3	5	0	3	0	1
	2	2	3	3		2	0	5	9	5
	2	9	1	6					---	---
	3	0	9	2					1	1
Referencia	C	C	G	T	A	T	A	A	---	---
Celular en cuestión	T	T	A	C	G	C	G	G	C	C

*Tabla de resultados; secuenciación del ADN mitocondrial (ADNmt), de la muestra tomada del celular comparada con secuencias de referencia.*

La comparación de las secuencias del ADNmt obtenido del celular con los de referencia reveló cuatro mutaciones de HV-1 y cuatro mutaciones en adición con dos inserciones de nucleótidos en HV-11. Las tres posiciones de los nucleótidos en transición 16290 de HV-I, 200 y 235 en HV-II, son relativamente raros encontrarlos en secuenciaciones de la población Japonesa (4% de 16290, 2% de 200 y 4% de 235). Estas mutaciones también son observadas en las poblaciones Europeas aunque la frecuencia puede ser más baja o igual a la población japonesa. En los Coreanos la frecuencia de la transición de los nucleótidos C a T en 16290 y de A a G en 235 es más alto al compararla con los japoneses (8.8% en 16290 y 9.5% en 235).

Con el análisis del genotipo del ADNmt extraído de la muestra de un cabello encontrado en el celular se llegó a la conclusión que el presunto delincuente no pertenecía a la población japonesa. Además también se demuestra que la secuenciación del ADNmt es más sensible que el análisis por STR, cuando las muestras se encuentran muy degradadas o es muy antigua. Se sugiere que el análisis del ADNmt debe ser utilizado de manera rutinaria en la práctica forense ya que se puede aplicar a varios especímenes forenses.



### 4.3.3 IDENTIFICACIÓN DE RESTOS ESQUELÉTICOS PRESUMIBLEMENTE SUMERGIDOS EN AGUA DURANTE TRES AÑOS POR PCR-STR.

En este caso se describe con éxito la identificación de restos saponificados de un cuerpo encontrado en el Río Sena por la tipificación del ADN. El ADN se tomó de el hueso (clavícula), que es difícil de extraer, por esta razón se incluye en este apartado el método de extracción.<sup>26</sup>

Los restos fueron encontrados en el Río Sena en los suburbios de París, Francia. La autopsia mostró un proceso de saponificación, en los pocos tejidos suaves que contenía el cuerpo. Los miembros y la cabeza no se encontraron y por consiguiente la identificación por huellas digitales o por los archivos dentales era imposible. Como no había ninguna muestra biológica disponible para este hombre, se confirmó la identidad del cuerpo con la prueba de paternidad inversa (la identificación del padre presunto por la comparación con el perfil genético de su hijo), la madre (la esposa de hombre difunto) era incluida en la prueba, para diferenciar en el perfil genético del hijo, los alelos paternal y maternal.<sup>26</sup>

Algunos autores reportan, que los resultados de la tipificación del ADN en cuerpos sumergidos en agua se retrasan hasta 18 meses. El problema principal para este tipo de análisis, es la recuperación de ADN de un tejido degradado y que no se sabe si la cantidad y calidad serán convenientes para la reacción de amplificación. K. Crainic, et al., utilizaron un método simple para extraer el ADN, el cual es difícil obtener de hueso, se extrajo de la siguiente manera: Se tomaron 3 cm de la clavícula, se aplastó y se pulverizó, se descalcificó por incubación con 50 mL de Tris 10 mM, EDTA al 0.5M y un buffer a pH 8.0, durante 48 horas. El hueso descalcificado es lavado tres veces en Tris al 10mM, EDTA 1 mM pH 8.0. Después de esto K. Crainic, et al hicieron una leve modificación utilizando un kit comercial (Qiamp). La centrifugación del paquete descalcificado del hueso (0.5mL) es digerido toda la noche a 56 °C con 60µL de proteinasa K en 540 µL de buffer ATL, proporcionado por el fabricante. Después, se le agregan 600 µL de buffer AL. Después se deja 10 minutos a 70°C, se le adiciona etanol antes de

cargar la columna de Qiamp con alícuotas de 750  $\mu$ L. Los pasos de lavados y de elusión propuestos por el fabricante deben de seguirse estrictamente.<sup>26</sup>

Se logró extraer el ADN del hueso, a pesar de que el hueso sumergido en agua es un material pobre para el análisis de ADN. En la literatura se reporta que en la extracción del hueso los pasos de descalcificación y purificación son críticos. Por lo cual se utilizó un método de descalcificación extenso, para remover los iones acumulados. La columna Qiagen permite la extracción y purificación del ADN en un solo paso. El método de extracción sugerido en este artículo rindió una cantidad conveniente para la amplificación y tipificación STR del ADN nuclear en una muestra muy degradada. Con este procedimiento, 34 ciclos (kit Profile Plus®) o 35 ciclos de amplificación y otra tipificación STR, se logró la confirmación de paternidad y por consiguiente la identificación de los restos anatómicos.<sup>26</sup>

#### 4.1.4 LA HISTORIA ABRAHAM, ISAAC Y JACOB

La ciencia forense ha tenido grandes adelantos tecnológicos en los últimos años, pero no sólo esto ayuda a resolver los casos forenses, el papel de los investigadores y de los científicos es muy importante y no debe minimizarse. En este artículo se presenta un caso en donde no sólo son importantes los adelantos tecnológicos, si no también, la intervención del científico, para el análisis de la evidencia.<sup>11</sup>

El caso presentado es de una niña de 5 años de edad que sufrió un ataque sexual violento. Aunque la niña era incapaz de dar una descripción exacta del atacante, si pudo describir un par de sandalias de playa de color azul. Los detectives investigaron el barrio para la búsqueda de un posible sospechoso. Recibieron el dato de una persona que sufría de sus facultades mentales, muy conocido en el barrio y que respondía al nombre de Isaac. La policía llegó a la casa del sospechoso y le pidieron que los acompañara, para que respondiera algunas preguntas. En la casa ellos notan que su hermano lleva las sandalias de playa descritas por la víctima. Al cuestionar a Isaac éste aceptó varias de las imputaciones, pero su declaración era incoherente, y sus versiones cambiaban en cada entrevista. Se le confinó en una institución mental, mientras se proseguía con la investigación. Cuando se presentó en la corte se permitió que su hermano Jacob lo acompañara.<sup>11</sup>

Para resolver este caso se tomó una muestra con un hisopo de la boca de la víctima, y se colectó la ropa que llevaba puesta durante el ataque, para someterse a un estudio en el laboratorio de Biología Forense.<sup>11</sup>

Se localizó un mancha de semen en los pantalones de la víctima por medio de la fosfatasa ácida, aunque no se visualizó ningún espermatozoide microscópicamente, entonces se realizó una prueba específica la proteína P30 que se encuentra exclusivamente en el líquido seminal, la cual dio positivo. El ADN se extrajo de los pantalones y de la muestra que se tomó de la boca de la víctima. El ADN extraído se amplificó por PCR. Se tipificó por STR. Los productos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida, definidos con tinción de plata.<sup>11</sup>

Con una orden judicial, se obtuvo una muestra de sangre del sospechoso, se extrajo el ADN, se amplificó, y se tipificó por STR. Los resultados obtenidos, no coincidieron con el ADN encontrado en la ropa de la víctima, por lo que la confesión del presunto sospechoso era falsa. Sin embargo era claro que había una similitud excepcional entre el perfil obtenido de Isaac y el ADN obtenido de los pantalones.<sup>11</sup>

La relación entre la probabilidad de que el delincuente pueda ser hermano (por ejemplo) de Isaac, a la probabilidad de que sea originario de una persona al azar de la población judía rinde una proporción de probabilidad de 54000.<sup>11</sup>

Apoyándose en el análisis estadístico, se pidieron las muestras de los dos hermanos de Isaac. Se analizó el ADN de Abraham eliminándose inmediatamente a través de la comparación del ADN. El hermano más joven (Jacob), que había acompañado a su hermano a todas las citas en el juzgado o la estación de policía y quien mostró gran apoyo para su hermano en el disturbio y que según los detectives no podía ser sospechoso ya que se encontraba en el servicio del ejército y no tenía ningún registro de delitos anteriores.<sup>11</sup>

Finalmente se obtuvo una muestra de Jacob, obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA 1 Resumen de los resultados de ADN para la muestra, los tres hermanos, y la víctima, se analizaron nueve loci STR.<sup>11</sup>

	TH01	TPOX	CSF1PO	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	FESFPS	F13A
Muestra	6,9	8,11	10,12	9,9	8,10	8,8	16,17	10,10	7,7
Isaac	6,9	8,11	10,12	9,9	8,10	8,11	18,18	10,10	7,7
Jacob	6,9	8,11	10,12	9,9	8,10	8,8	16,17	10,10	7,7
Abraham	6,9	8,8	10,11	9,9	8,10	11,11	----	-----	-----
Victima	7,9	8,9	11,12	9,12	8,12	10,13	17,18	10,11	6,15

TABLA 2 Resultados de los análisis de STR usando el AmpF $\Phi$ STR SGM Plus Múltiplex para la muestra, para Isaac y su hermano Jacob.

	XY	D8	D21	D18	D3	vWA	D16	D2	D19	TH01	FGA
Muestra	XY	10,13	27,28	14,14	14,17	16,17	8,8	19,19	15,15.2	6.9	25,27
Isaac	XY	12,13	27,28	14,14	14,15	18,18	8,11	19,26	13,15.2	6.9	24,25
Jacob	XY	10,13	27,28	14,14	14,17	16,17	8,8	19,19	15,15.2	6.9	25,27

Con los resultados mostrados en las tablas se comprueba la culpabilidad de Jacob.<sup>11</sup>

En conclusión, uno de los papeles principales de un científico forense es ayudar en las investigaciones, encontrando indicios en la escena del crimen, analizando la evidencia biológica, y comparando el ADN de las muestras de referencia, con las desconocidas.<sup>11</sup>

## Capitulo V

5. *Discusión*.....60

5.1 *Conclusiones*.....61

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## 5. DISCUSIÓN

Antes del análisis del ADN en el área forense se presentaban grandes dificultades para la resolución de asesinatos o la posible identificación de personas extraviadas. Uno de los principales inconvenientes era el medio ambiente, ya que al transcurrir el tiempo se degradaban las muestras que se utilizaban para la resolución de un posible delito. Anteriormente el único medio confirmatorio de un crimen eran las huellas digitales.

En los 80's se logró un gran avance al conocer en detalle las regiones del ADN, el primero en realizar estos estudios fue Alec Jeffrey, el cual obtuvo un patrón de bandas parecido a un código de barras llamándolo huella digital genética. Los marcadores moleculares de elección para estas pruebas son las regiones con repeticiones en tandem de número variable (VNTR) y las repeticiones cortas en tandem (STR), los cuales tienen unidades de repeticiones de 30 pares de bases en promedio, y de 2 a 5 pares de bases, respectivamente. Con estas técnicas se permitió diferenciar a un individuo o la determinación de relaciones biológicas de parentesco.

La técnica de análisis de ADN que utilizaba Jeffrey era la de Southern blot, era un buen método para pruebas de identidad, pero presentaba ciertas limitaciones una de ellas era la cantidad de ADN de alto peso molecular, además de que es muy laboriosa y existe cierta imprecisión para resolver los alelos.

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el área forense causó un gran impacto, la conformación del ADN de un sujeto es altamente distintivo, muchos loci son muy variables en una misma población. La amplificación de múltiples genes por PCR se está utilizando para determinar el parentesco en casos de disputa de la paternidad y en casos de inmigración. Los análisis por PCR de manchas de sangre y de muestras de semen han aportado información en numerosos casos de asaltos y violaciones. Es normal encontrar cabellos en los escenarios del crimen. La raíz de un cabello contiene suficiente ADN para ser analizado por PCR.

El método de PCR permite trabajar cantidades insignificantes de ADN que pueden obtenerse de fuentes muy diversas como manchas de sangre, semen, hueso, bloques de parafina, etc.

Cuando el ADN nuclear es insuficiente en cantidad y calidad se utiliza el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt), éste es utilizado en países desarrollados como E.U. Éste al igual que la amplificación por PCR y la tipificación del STR, ha sido reconocido en el área forense, es un método que permite la identificación de individuos, por ejemplo, con un solo cabello aunque no tenga el bulbo (en el que se encuentra el ADN nuclear). Esta técnica aún no se aplica en México en el área forense, porque es un método muy costoso, no sólo a nivel económico, sino en tiempo y esfuerzo, ya que se aplican numerosas técnicas de biología molecular para obtener un resultado único y porque las muestras suelen ser degradadas o muy pequeñas, requiriendo así muchas reacciones y procedimientos de control.

En México se utiliza la PCR en combinación con el STR por electroforesis capilar la cual proporciona una buena separación, resolución, sensibilidad y precisión. Es menos laboriosa y tediosa que la electroforesis normal, además de que se consume menos tiempo.

Con el análisis del ADN se ha logrado anular condenas de personas inocentes, en muchos casos esta prueba ha demostrado con solidez científica que algunos de estos individuos eran inocentes. Con la unión de las técnicas policíacas tradicionales en combinación con la ciencia se ha logrado atrapar a los culpables y ha podido salvar personas inocentes.



## 5.1 CONCLUSIÓN

El avance científico ha permitido la introducción de la tecnología del ADN en la investigación forense, facilitando el estudio de los indicios biológicos mínimos, lo cual era imposible años atrás. El estudio del ADN en la actualidad es fundamental para la identificación tanto en la investigación criminal, como en la investigación en casos de paternidad. Para lograr los objetivos antes mencionados se debe de haber realizado un buen trabajo por parte del equipo de investigación, desde la recogida del indicio hasta su procesamiento dentro del laboratorio. El químico dentro del laboratorio debe estar capacitado para manejar muestras que por su fragilidad pueden alterarse o perderse como consecuencia de un mal manejo, permitiendo así su estudio y la resolución de un caso.

Con la llegada de la PCR y en combinación con una adecuada tipificación del ADN es posible resolver casos que habían quedado inconclusos, o muchos otros que por el medio ambiente el ADN había sido degradado o se encontraba en poca cantidad y no podían ser tipificados con otros métodos como el RFLP, que requiere de una gran cantidad y pureza del ADN. Un método de tipificación de ADN que se utiliza de manera rutinaria es el STR, ya que se pueden determinar cantidades pequeñas y degradadas de ADN, en México se comenzó a utilizar en los laboratorios forenses en los años 90's.

Los perfiles de ADN, el estudio de huellas digitales, bancos de datos computarizados, todo esto está usándose como arma para rastrear y aprehender criminales. La ciencia esencialmente ha dado nuevas esperanzas a expedientes viejos y para casos antes considerados irresolubles.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Dove Alan. The long arm of ADN. *Nature Biotechnology* 1999;17:649-651.
2. Bjerre An, et al. A report of the 1995 and 1996 paternity testing workshops of the English speaking working Group of the International Society for Forensic Haemogenetics. *Forensic Science International* 1997;90:41-45.
3. Akane Atsushi, et al. Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an x-y homologous gene. *Forensic Science International* 1992;52:143-148.
4. Sivagami A.V., et al. A simple and cost-effective method for preparing ADN from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population. *Forensic Science International* 2000;110:107-115.
5. White A. Bruce. *PCR Protocols*. USA:Human Press,1991:vol.15:1-41, 81-95.
6. Jeffrey C. Ray. *Criminology and interdisciplinary approach*. USA;Prentice Hall,1990:166-185.
7. Budowle B. y Brown BL. El uso del análisis de AND en la identificación forense. *Forensica* 2001;1(1):9-22.Revisión.
8. Budowle B.. et al. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African America, U.S. Caucasian, Hispanics, Bahamians, Jamaicans and Trinidadians. *J. Forensic Sci* 1999; 44(6): 1277-86.
9. Budowle B.. et al. Validation studies of the CTT STR multiplex system. *J. Forensic Sci* 1999; 42(2): 701-7.
10. C. Cattaneo et al. A simple method for extracting ADN from old skeletal material. *Forensic Science International* 1995;74:167-174.
11. Carla Oz, et al. "The story of Abraham, Isaac and Jacob" or "Am My Brother's Keeper?. *J Forensic Sci* 2003;48(1):137-138.
12. Comey, et al. Validation studies on the analysis of the HLA- DQ $\alpha$  locus using the polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci*1993;38(2):239.

13. Comey, et al. PCR amplification and typing of the HLA DQ $\alpha$  gene in forensic samples. *J. Forensic Sci* 1991;36(6):1633.
14. Steftend L. David, et al. Multiplex amplification of STR loci with gender alleles using infrared fluorescence detection. *Forensic Science International* 1997;85:225-232.
15. Noble. Deborah. Forensic PCR, primed, amplified, and ready for court. *Analytical Chemistry*; October 1, 1995:613A-615A.
16. Shutler G. Gary, et al. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J. Forensic Sci* 1999; 44(3): 623-626.
17. Hadelberg et al, Ancient bone DNA amplifies. *Nature* 1990: 342-485.
18. Herlich A. Henry. PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. W. H. Freeman and Company. New York 1992:209-223.
19. Hochmeister, et al. Typing of DNA extracted from compact bone from human remains. *J. Forensic Sci* 1991;36 (6):1649
20. Griffin G. Hugh, Griffin M. Annette. PCR Technology, Current Innovations. U.S.A: CRC Press, 1994:260-306.
21. Hugichi, et al. DNA typing from single hairs. *Nature* 1988:322, 543.
22. I.A Pretty. and Sweet D. A look at forensic dentistry, Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *British Dental Journal* 2001;190, No 7:359-366.
23. Nicklas A. Janice and Buel Eric. Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2003.
24. Álvarez J.C.. Análisis del ADN mitocondrial. *Forensica* 2001, 1(1):40-59. Revisión.
25. Luque José - Herráez Angel. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid. Harcourt, 2001: 87-91, 133-139, 141-196.
26. Andersen F. Julia, et al. Further validation of multiplex STR system for use in routine forensic identity testing. *Forensic Science International* 1996;78:47-64.

27. Cranic K., et al. Skeletal Remains Presumed Submerged in Water for Three Years Identified Using PCR-STR Analysis. *J. Forensic Sci* Sep 2002; 47(5): 1025-1027.
28. Reischl Kochanowski. *Quantitative PCR protocols*. USA: Humana Press, 1999: 3-31
29. Castaño L., Bilbao J.R. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PRC. *An Esp Peditry* 1997; 46:305-310.
30. Links, et al. Molecular genetic diagnostics of cycle-cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. *Hum. Genet* 1989; 81:363.
31. Carey Loucinda. Trends in DNA forensic analysis. *Electrophoresis* 2002;23:1386-1397.
32. McPherson, Quirke and Taylor. *PCR a practical Approach*. England: Oxford University Press, 1994:vol 1: 1-67, 121-135.
33. Gay Aler Mercedes, Lozan Carrasco.Félix. Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de identificación genética. Grupo español y portugués de la ISFG. *Madeira* 2000:1- 43
34. Innis Michael, Gelfad David H., Sninsky John J. *PCR applications*. USA: Academic Press, 1999: 3-33, 105-180.
35. Nicklas JA, Buel E. Development of an Alu-based, QSY 7-labeled primer PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *J Forensic Sci* 2003; 48(2):282-91.
36. Peter White. *Crime scene to court the essential of forensic science*. Royal Society of Chemistry. London 1998.1-14, 4-72, 289-325.
37. Gill Peter. The utility of "substrate controls" in relation to "contamination". *Forensic Science International* 1997;85:105-111.
38. Presley, et al. The effects of specific latent fingerprint and questioned document examinations on the amplification and typing of the HLA DQ $\alpha$  gene region in forensic casework. *J. Forensic Sci*; 38(5):1028, 1993.
39. Ralph Rapley. *PCR secuencing Protocolo*. USA: Humana Press, 1996:1-35.

40. Rancel-Villalobos H. La huella genética del DNA en varones: Rev. Invest Clin 2001; 53(5):311-316.
41. Randal K. Saiki. Primer-Direct Enzymatic Amplification on DNA with a Thermoestable DNA Polymerase. Science; 39(1988):487-491.
42. Remick D.G, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA. Theory and applications of the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol, 1990;93(4 Suppl 1):S49-54. Review.
43. Saferstein Richard. Criminalística an Introduction to Forensic Science. Sixth edition, USA: Prentice Hall, 1998: 402-436, 542-549.
44. Saferstein Richard. Lab Manual Criminalística an Introduction to Forensic Science. Sixth edition. USA: Prentice Hall; 1988: 323-364.
45. Feles Rosalinda A., Alasdair C. Stamps. Polimerase Chain Reaction (PCR) the technique and its applications. USA: Landes company Austin 1993:1-55.
46. Rostedt et al. Genotyping of five short tandem repeat loci via triples and duplex PCR. Forensic Science International. 1996; 82: 217-226.
47. Lisker Rubén, Armendares Salvador. Introducción a la Genética Humana. 2ª edición. Madrid: Manual Moderno, 2001: 1-11, 53-62.
48. Saiki, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences an restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985, 230,1350.
49. Sajantila, et al. PCR amplification of alleles at the D2S80 locus, comparison of Finish and Nort American Caucassian population sample, and forensic casework evaluation. Am. J. Hum Gen 1992;50: 816.
50. Westwood Sara A. and Werrett.David J. An evaluation of the Polymerase chain reaction method for forensic applications. Forensic Science International, 1990;45: 201-205.
51. Shihenori Ikemoto, et al. Molecular genetic basis of red cell markers and forensic application. Forensic Science International, 1996;80:147-161.
52. Shouthern, Nouthern. Genética Clínica. USA: McGrawn Hill. 1992: 49-55.
53. Sutherland B, Cordiner S, Bright JA, Walsh S.J.Wickenheiser. Commentary on trace DNA: a review, discussion of theory and application of the transfer

- of trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci* 2002; 47(3):442-50.
54. Moretti Tamyra R., et al. Validation of STR for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR system and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J. Forensic Sci*, 2001; 46(3): 647-660.
55. Moretti Tamyra R., et al. Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *J. Forensic Sci*. 2001; 46(3): 661-676.
56. Gyllensten Ulf B., et al. DNA Typing of forensic material with mixed genotypes using allele-specific enzymatic amplification (Polymerase Chain Reaction). *Forensic Science International*, 1992;52:149-160.
57. Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 2003 ; 315(1):122-8.
58. Yasuhisa Seo, et al. Mitochondrial DNA and STR Typing of matter adhering to an earphone. *J. Forensic Sci*. 2002; 47(3): 605-608.
59. Zoderman Jon. *Laboratorio de Criminalística*. México: Limusa, 1993: 55-92.

## GLOSARIO

**Ácido desoxirribonucleico (ADN).** Polímero lineal de elevado peso molecular, constituido por los nucleótidos adenina, citosina, guanina y timina, cada uno de los cuales contiene desoxirribosa como azúcar. El ADN constituye la base de la transmisión genética y de la herencia biológica.

**Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt).** Su forma es de doble hélice circular semejante al ADN bacteriano.

**Ácido desoxirribonucleico nuclear.** Asociado con las proteínas y repartido en los cromosomas.

**Adenina.** Derivado purínico constituyente de los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleicos, así como de algunas coenzimas (NAD, NADP).

**Alelo.** Cada una de las variantes génicas que puede ocupar un locus cromosómico y que controla el mismo carácter.

**Amortiguador.** Sistema capaz de amortiguar las variaciones en la concentración de hidrogeniones, producidas por la adición o incorporación de ácidos y bases, y de mantener un pH relativamente estable.

**Amplificación.** Acción de incrementar el número de copias de una secuencia diana de ADN. Ésta puede realizarse *in vivo* o *in vitro* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

**Citosina.** Base oxiaminopirimidina,  $C_4H_5N_3O$ , componente del ácido nucleico. Desoxirribonucleasa.

**Diploide.** Dícese del cromosoma apareado normal después del desdoblamiento de los cromosomas primitivos de las células germinativas en la fecundación.

**Electroforesis.** Método que permite separar determinados constituyentes de una solución coloidal someténdola a la acción de una corriente eléctrica. Las partículas o micelas cargadas con electricidad positiva o negativa emigran cada una hacia el polo opuesto a una velocidad diferente según su carga y dimensiones.

**Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).** Segmento del ADN que ha sido escindido por una endonucleasa de restricción.

**Guanina.** Base cristalina aminooxipurina, uno de los productos de la descomposición de la nucleína, encontrada en el gusano y varios tejidos animales. Es una de las cuatro bases del ADN.

**Loci.** Lugar. Punto en un cromosoma ocupado por un gen.

**Locus.** Plural de *loci*

**Microsatélite.** Tipo de ADN satélite que consiste en pequeñas unidades repetidas, por lo usual de 2, 3, 4 hasta 7 bp, que aparecen en tandem.

Mutación: Alteración en la secuencia del ADN.

**Número variable de repeticiones en tandem (VNTR).** Polimorfismo creado por variaciones en el número de repeticiones minisatélites en una región cromosómica definida.

**Oncogén.** Segmento del material genético heredado en las células, que codifica la producción de la proteína transformante responsable de la génesis de determinados tumores.

**Oligonucleótido.** Secuencia de ADN constituida por un pequeño número de nucleótidos.

**Polimorfismo.** En general, existencia de una población de dos o más genotipos alternativos determinados por factores genéticos que presentan frecuencias demasiado elevadas para que puedan ser mantenidas por la mutación.

**Primer.** Cadena corta de polinucleótido preexistente a la cual puede agregarse nuevos desoxirribonucleótidos por acción de la enzima ADN polimerasa.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Proceso *in vitro* que incrementa la cantidad de un fragmento de ADN pequeño previamente seleccionado.

**Timina.** Base pirimidínica que entra en la constitución del ácido desoxirribonucleico.