



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“UTILIDAD FORENSE DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PERSONAS EN COMISIÓN  
DE UN DELITO”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALMA ROSA FAJARDO VENEGAS

ASESOR

QFB. MARÍA GALIA MARTÍNEZ FLORES

MARZO 2008.



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mis padres**

Por darme la vida e inculcarme los valores que ahora poseo, por todo el amor, apoyo, comprensión y sobretodo por la confianza que a lo largo de mi vida he recibido, gracias a ustedes hoy logro una meta más dentro de mi carrera profesional.

### **A mis hermanas Adriana, Paloma y Blanca**

Por compartir tristezas y alegrías, y por alentarme a seguir preparándome para enfrentar a la vida.

### **A mis sobrinos Antonio, Mariana, Víctor y Leonardo**

Por ser mi inspiración para seguir superándome y ser mejor cada día.

### **A Mamá toña y a mis tías Isabel y Amelia**

Por su apoyo, enseñanza y consejos para seguir adelante con mis estudios.

### **A mi tío José**

Por estar siempre al pendiente de mi y apoyarme en todo.

### **A José Luis**

Por estar conmigo en todo momento, pero sobretodo por la paciencia y comprensión que siempre me has brindado.

### **A mis amigos**

Alicia, Anay, Edgar, Erick, Jazmín, Irais, Isaac, Israel, Mauricio y Ricardo, por brindarme su amistad y por compartir experiencias inolvidables.

*“Por todo lo que he aprendido de ustedes para ser mejor en lo profesional como en lo personal, gracias. Los quiero.”*

## ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 ADN (Acido Desoxirribonucleico)	3
3.2 El ADN como material genético y hereditario	5
3.3 Polimorfismos del ADN	7
3.4 Tipos de polimorfismos	9
3.4.1 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)	9
3.4.2 Polimorfismos de secuencia repetida	11
3.5 Otros marcadores de ADN con interés forense	12
3.5.1 Amelogenina: marcador de sexo	12
3.5.2 STRs del cromosoma Y	12
3.5.3 ADN mitocondrial	13
3.6 Métodos para el análisis de polimorfismos de interés forense	15
3.6.1 Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)	15
3.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
3.7 Riesgos y limitaciones de la PCR	22
3.8 Electroforesis	24
3.9 Problemática que se plantea durante la recogida y envío de muestras	25
3.9.1 Contaminación biológica de origen humano	25
3.9.2 Putrefacción de las muestras	27
3.9.3 Utilización de tratamientos físicos y/o químicos	28
4. Precauciones generales durante los procesos de recogida y envío de muestras	29
4.1 Gestión de muestras y cadena de custodia	30
4.2 Base de datos con fines de investigación forense	31
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
6. OBJETIVO	33
7. METODOLOGÍA	34

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
9. CONCLUSIONES	36
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
11. GLOSARIO	41

## 1. RESUMEN

Cualquier tipo de organismo se puede identificar al examinar las secuencias de ADN (Acido desoxirribonucleico) únicas de ésta especie. La identificación de individuos dentro de una especie es menos exacta en esta época, por lo que la tecnología progresa cada vez para obtener segmentos muy grandes del ADN, e incluso genomas enteros que permiten la identificación individual exacta, como es la reacción en cadena de la polimerasa.

Para identificar a individuos, los científicos forenses exploran regiones del ADN que varíen de persona a persona y utilizan estos datos para crear un perfil del ADN (llamado huella digital del ADN). Solamente un solo por ciento del ADN (cerca de 3 millones de bases) se diferencia a partir de una persona a otra. Los científicos pueden utilizar estas regiones variables para generar un perfil de ADN de un individuo, usando muestras de sangre, semen, saliva, hueso, pelo, y otros tejidos finos y componentes del cuerpo.

En casos criminales, generalmente se obtienen las muestras de la evidencia del crimen-escena y de un sospechoso, se extrae el ADN, y se analiza de ella la presencia de un sistema de regiones específicas de ADN (marcadores). Ya encontrados los marcadores en la muestra del ADN diseñado, los pedazos pequeños de ADN (puntas de prueba) se enlazan a una secuencia complementaria del ADN de la muestra. Y una vez obtenida una serie de límite de puntas de prueba a una muestra de ADN se crea un patrón distintivo para un individuo, los científicos forenses comparan estos perfiles de ADN para determinar si la muestra del sospechoso coincide con la muestra de la evidencia, para confirmar su culpabilidad o de excluirlo.

## 2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo social ha traído consigo una modificación de la tipología delictiva, que ha hecho determinar tipos de actos criminales caracterizados por su violencia con una notable desproporción de fuerzas entre víctima y agresor al igual que la utilización de instrumentos y armas que hacen que las evidencias o indicios dejados en el lugar de los hechos, por el autor o autores sean mínimas. Paralelamente, el desarrollo científico ha posibilitado la aplicación de nuevas tecnologías, que han ido profundizando en su capacidad de identificación sobre indicios cada vez más pequeños; debido a que el máximo exponente en el momento actual es la denominada tecnología del ADN.<sup>1</sup>

Hablar hoy en día del ADN en el campo de la Genética Forense no resulta desconocido, ni siquiera novedoso. En general ha conllevado un desarrollo que ha obligado a una notable evolución de las técnicas aplicables en la identificación forense, y para poder estudiar determinados fragmentos del ADN de una longitud relativamente grande, a analizar pequeñas regiones procedentes de indicios mínimos por medio de su amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Todo ello ha supuesto una importante modificación tanto en lo cuantitativo como en lo cualitativo de los indicios biológicos.<sup>2</sup>

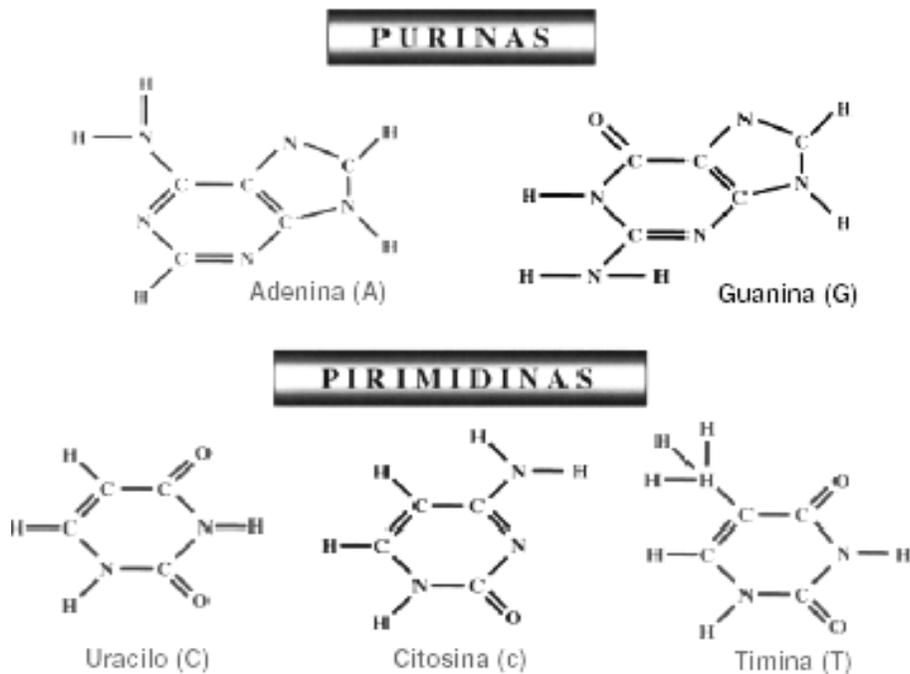
Sin embargo, para que de los indicios biológicos se pueda obtener información genética que conduzca a la identificación de personas, los procesos de recogida, almacenamiento y envío de dichos indicios o restos biológicos, deben tratarse con extremadamente cuidado, siguiendo normas específicas, haciendo hincapié en algunos tipos delictivos que por sus características en relación a la gravedad y trascendencia de los mismos, deben ser estudiados más detenidamente.<sup>3-6</sup>

Es importante tener una visión y concepto integral del indicio en el proceso de la investigación biológica en cada una de las fases de la investigación criminal, así como un conocimiento del papel que se debe desempeñar para la buena marcha de la investigación, y la consecución del objetivo final. La cual es la identificación de un perfil genético del presunto sospechoso para su valoración en el proceso judicial.<sup>7</sup>

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 ADN (Acido Desoxirribonucleico)

El ADN (Acido desoxirribonucleico) es la molécula portadora de la información genética en la célula. Su estructura consiste en una hélice formada por una doble cadena en la que los eslabones son unas unidades químicas denominadas *nucleótidos*. Los nucleótidos están constituidos por tres componentes: un azúcar, un fosfato y una base nitrogenada. Existen cuatro nucleótidos distintos que se diferencian en la base que portan: **A** (adenina), **C** (citosina), **G** (guanina), o **T** (timina). Por tanto, puede decirse que el alfabeto del ADN está compuesto por cuatro letras cuya combinación a lo largo de la molécula puede dar lugar a infinidad de secuencias distintas. El orden o secuencia en que se disponen los diferentes nucleótidos a lo largo de la cadena determina la información genética.<sup>15</sup>



**Fig 1.** Bases presentes en los ácidos nucleicos: guanina (G), adenina (A) y citosina (C), la timina (T) sólo se encuentra en el ADN y es substituida en el ARN por el uracilo (U).<sup>15</sup>

En la estructura de doble hélice del ADN (descrita por primera vez por Watson y Crik en 1953), las dos cadenas permanecen unidas mediante un proceso llamado hibridación. En esa doble cadena hay unas reglas fijas de complementariedad: la Adenina de una cadena siempre se aparea con la Timina en la cadena complementaria (mediante dos puentes de hidrógeno) y la Citosina con la Guanina (mediante tres puentes de hidrógeno). Esto permite que conociendo la secuencia de una de las cadenas pueda deducirse la cadena complementaria.<sup>15, 16</sup>

La hibridación es una propiedad fundamental del ADN en su estado natural en la célula. Sin embargo, los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos cadenas pueden romperse mediante elevación de la temperatura o tratamiento químico, proceso llamado *desnaturalización*. Un procedimiento común para desnaturalizar la doble cadena del ADN es calentarlo a temperaturas cerca al punto de ebullición o bien exponerlo a agentes químicos desnaturalizantes, como la urea o formamida. La desnaturalización es un proceso reversible: si un fragmento de ADN se calienta se separan sus dos cadenas, pero si se disminuye la temperatura, las cadenas de ADN encontrarán a su complementaria y se unirán mediante un proceso llamado *renaturalización*.<sup>17, 18</sup>

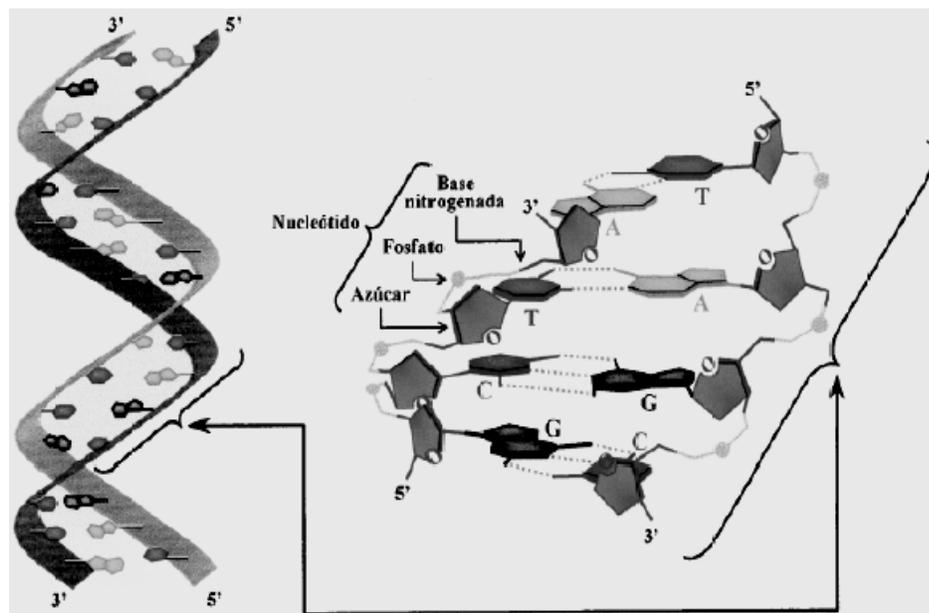


Fig 2. Representación esquemática de la estructura de la doble hélice del ADN.<sup>16</sup>

### 3.2 EL ADN COMO MATERIAL GENETICO Y HEREDITARIO

La unidad vital básica es la célula, que funciona como una fábrica en miniatura produciendo los mismos materiales y la energía necesaria para mantener la vida. Un ser humano está compuesto por un promedio de aproximadamente 100 billones de células, las cuales se originan a partir de una única célula: el cigoto originado por la fertilización de un ovulo por un espermatozoide.

En una célula humana, el ADN se localiza principalmente en el núcleo, aunque también existe una pequeña cantidad de ADN en las mitocondrias, que son los organelos celulares encargados de la producción de energía. El ADN nuclear se encuentra dividido y muy compactado en los cromosomas, que son unas estructuras muy densas formadas por ADN y proteínas. El genoma humano nuclear consiste en 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (X e Y), cuya combinación determina el sexo femenino (XX) o masculino (XY). En conjunto cada célula somática tiene 46 cromosomas.

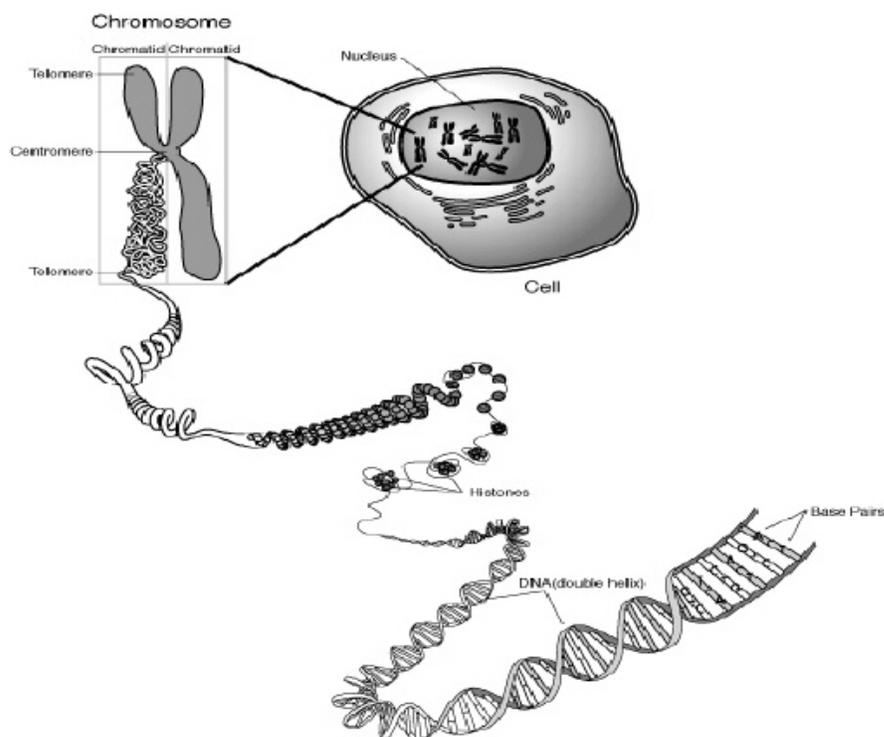


Fig.3 Posición del ADN dentro del núcleo celular.<sup>19</sup>

La mayor parte de los análisis de identificación genética humana se centra en marcadores polimórficos localizados en los cromosomas autosómicos, y la determinación del sexo se lleva a cabo con algunos marcadores localizados en los cromosomas sexuales. No obstante, el análisis del ADN mitocondrial y de otros marcadores polimórficos en los cromosomas sexuales (principalmente en el cromosoma Y) esta ganando un creciente interés debido a sus especiales particularidades.<sup>9,19</sup>

En todas las células somáticas del cuerpo, el ADN se encuentra en estado diploide, o sea, existe dos ejemplares de cada cromosoma. Sin embargo, en las células germinales (como consecuencia de la meiosis en la gametogénesis) el ADN esta en estado haploide, es decir, el óvulo y el espermatozoide contienen una única dotación de cada uno de los cromosomas. Cuando ambos gametos se combinan durante la fecundación, el cigoto originado vuelve a ser diploide y el individuo resultante (formado por multitud de células somáticas genéticamente idénticas originadas como consecuencia de la mitosis) habrá heredado un 50% de la información genética del padre y el otro 50% de la madre.

El genoma humano está constituido por unos 3,000 millones de pares de bases. Solo el 2 % del ADN es codificante, o sea, forma parte de los genes. El 98% restante constituye el ADN no codificante al que se le atribuye una función estructural y reguladora. En este ADN se concentra la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos, ya que sus mutaciones no están sometidas a una selección tan fuerte como las que ocurre en el ADN codificante, que puede tener consecuencias fenotípicas.<sup>1,9</sup>

### 3.3 POLIMORFISMOS DEL ADN

Todos los individuos de la especie humana son idénticos entre sí en un 99.98% de su ADN, y solo en el 0.02% restante (aproximadamente 600 mil nucleótidos) residen las diferencias entre unos y otros y que nos hacen un ser único (salvo en el caso de gemelos univitelinos que son genéticamente idénticos). Dentro de esta pequeña proporción de ADN existen regiones hipervariables o polimórficas que son las que permiten usar la información genética con fines de identificación.

Un polimorfismo puede consistir en la sustitución de una simple **base nitrogenada** (por ejemplo, la sustitución de una A (**adenina**) por una C (**citocina**) o puede ser más complicado (por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada del ADN). Este hecho es de suma importancia pues confiere a este tipo de secuencias la característica primordial del análisis genético, la variabilidad.

La posición que ocupa una determinada secuencia de ADN en el cromosoma se llama locus y las variantes de este es lo que conocemos como alelos. Sin embargo, este tipo de alelos son, afortunadamente muy poco frecuentes entre individuos. Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. Es importante reseñar que la variabilidad genética entre individuos se concentra principalmente en el ADN no codificante y que, por tanto, un análisis de individualización genética con fines forenses no se puede extraer ningún tipo de información sobre características fenotípicas (rasgos físicos, susceptibilidad a enfermedades o fármacos).

Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNP's (Polimorfismos de Nucleótido Sencillo) y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencia repetidas y/o rearrreglos cromosómicos, debido a que el genoma humano no es una estructura pasiva; al contrario el ADN esta expuesto a un sin número de alteraciones. Estos cambios en el ADN son llamadas mutaciones, los cuales pueden ser originados por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como por factores ambientales.<sup>20</sup>

Las aplicaciones del estudio de los polimorfismos son diversas; por un lado sirven para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva. Por otro, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y en el estudio de las enfermedades multigénicas.<sup>21</sup>

### 3.4 TIPOS DE POLIMORFISMOS

Básicamente existen dos tipos de polimorfismos, los que derivan de la substitución de un nucleótido por otro (polimorfismos de secuencia) y los que derivan de la inserción o deleción de fragmentos de ADN y las repeticiones de secuencias de entre dos y cientos de nucleótidos (polimorfismos de longitud o de secuencia repetida).

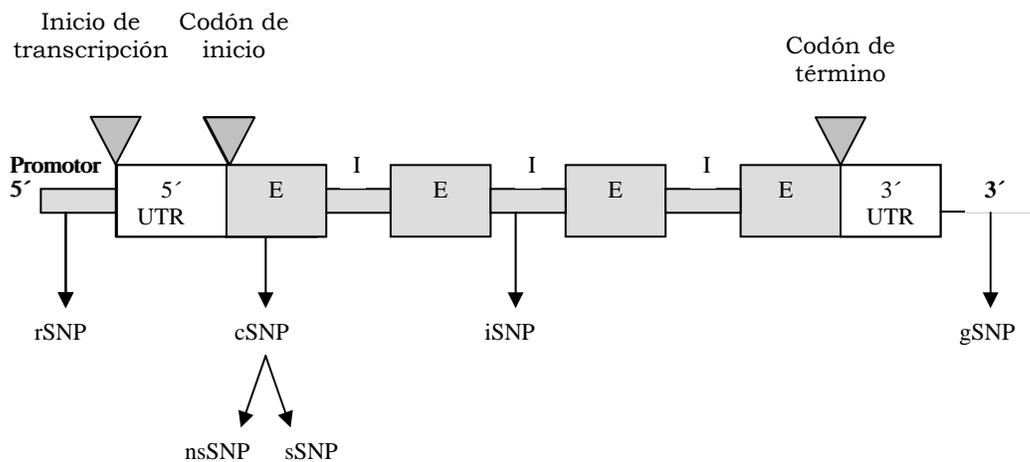
#### 3.4.1 Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

Las diferentes formas de polimorfismos llamados alelos, son mas frecuentes que las mutaciones. La gran mayoría de los SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) tienen dos alelos los cuales están representados por una substitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para alelo menos frecuente.

Actualmente, en el “dbSNP” (base pública de datos de PNS, dbSNP's por sus siglas en ingles) se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN.<sup>22,23</sup> Se describe que los SNP's se presentan uno cada 200 pares de bases en el genoma humano. Basado en ello se esperaría que existieran aproximadamente 6 mil millones de SNP's en el genoma humano, muchos de los cuales ya han sido descritos en el dbSNP.<sup>24</sup> Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar cambio de un aminoácido; a este tipo de SNP's se les conoce como “no sinónimos”. Puesto que a este tipo de SNP's afecta directamente la función de la proteína. Así mismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de splicing (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas.<sup>25-27</sup>

Otro tipo de SNP's son los llamados "sinónimos o silenciosos" los cuales no alteran la conformación del gen; sin embargo se ha descrito que alguno de estos polimorfismos puede tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido. Según su localización en el genoma, los SNP's se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras, y gSNP, localizados en regiones intragenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP).<sup>28-29</sup> Los SNP's a diferencia de otros tipos de polimorfismos es que presentan una tasa menor de mutación por lo que es de gran ayuda en estudios de genética.

Un nivel de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos de un conjunto de SNP's a lo largo de un mismo cromosoma que son heredados como una unidad. La diferencia fundamental entre un haplotipo y los SNP's individuales, es que los alelos en los haplotipos son asignados a un cromosoma. Prácticamente cada individuo tendrá dos haplotipos para un fragmento del genoma, representados por los cromosomas materno y paterno. Estos haplotipos son de utilidad, ya que proporcionan información acerca de la recombinación. La información de este tipo de datos es importante ya que nos permite mutaciones que pueden ser causantes de alguna enfermedad.<sup>30</sup>



**Fig.4** Clasificación de los SNP's de acuerdo a su localización en el genoma. (E: exones, I: intrones, UTR: Regiones no codificantes).<sup>29</sup>

### 3.4.2 Polimorfismos de secuencia repetida

Este tipo de polimorfismos tienen mayor aplicación en el diagnóstico genético y son conocidos como VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), minisatélites; y microsatélites o STR (*Short Tandem Repeats*). En ambos casos presentan un número variable de repeticiones en tándem.

Los VNTR o minisatélites son locus que corresponden a secuencias de ADN de unas pocas decenas de nucleótidos repetidos en tándem. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, de forma que en un cromosoma el número de repeticiones en tándem puede ser de 10, en otro de 15, etc. La singularidad más especial de este tipo de polimorfismos está en que cada locus puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones), sin embargo presentan el inconveniente de que no están distribuidos por todo el genoma y sólo pueden ser utilizados en el diagnóstico de un número muy reducido de enfermedades. Los VNTR han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial. Cuando se habla de huellas digitales se está hablando de este tipo de polimorfismo.

Los STR o microsatélites son por excelencia los polimorfismos anónimos utilizados en el diagnóstico genético. Corresponden a la repetición en tándem de secuencia entre 2 y 6 nucleótidos. Los microsatélites presentan dos características que los hacen ideales para su uso. En primer lugar están distribuidos de forma casi homogénea en todo el genoma, y en segundo presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada.<sup>31</sup>

### 3.5 OTROS MARCADORES DE ADN CON INTERÉS FORENSE

Existen otros marcadores genéticos de especial relevancia, algunos de los cuales presentan determinadas peculiaridades que los hacen idóneos para aplicaciones concretas.

#### 3.5.1 Amelogenina: marcador de sexo

La amelogenina es un locus localizado en una región homóloga de los cromosomas sexuales. Existe una diferencia de 6 pares de bases entre el tamaño del alelo presente en el cromosoma X y Y, que se debe a una pequeña *deleción* en el cromosoma X. El resultado de la amplificación por PCR de este locus en un ADN femenino (XX) será de una única banda (de 106 pares de bases, con los cebadores más comúnmente utilizados), mientras que si el ADN es masculino (XY), el resultado serán dos bandas de distinto tamaño (106 y 112 pares de bases, comúnmente).

La mayoría de los kits comerciales actuales incluyen este marcador, que permite la designación del sexo del individuo donante de la muestra. No obstante, hay que tener en cuenta que, aunque ocurre con muy baja frecuencia, se ha detectado la existencia de deleciones en esta región del cromosoma Y, de tal forma que una muestra masculina podría asignarse erróneamente como femenina. En este caso, el análisis de marcadores específicos del cromosoma Y permitirían una correcta asignación del sexo.

#### 3.5.2 STRs del cromosoma Y

El cromosoma Y presenta una diferencia importante respecto al resto de cromosomas, su herencia es exclusivamente paterna, es decir, se transmite de padres a hijos varones sin que exista la posibilidad de recombinación. Por tanto, la información genética contenida en el mismo se hereda como *haplotipo*, o sea, los genotipos para cada uno de los marcadores del cromosoma Y se transmiten en bloque y no de forma independiente. De esta forma, salvo posibles mutaciones, todos los individuos varones emparentados por vía paterna comparten el mismo haplotipo para el cromosoma Y.

En Genética Forense, resulta de especial utilidad en los casos de agresión sexual. En estos es común encontrar evidencias donde existe una mezcla de células femeninas de la víctima y masculinas del agresor. Aunque existen métodos de extracción basados en una lisis diferencial que permite la separación del ADN de las células epiteliales (normalmente vaginales) del ADN de los espermatozoides, esta separación no siempre es posible, especialmente si los espermatozoides están muy deteriorados o el agresor es azoospermico. En estos casos, el uso de marcadores específicos del cromosoma Y aumenta las posibilidades de detectar pequeñas cantidades de ADN masculino presentes en una mezcla con abundante ADN femenino. Estos marcadores han demostrado también su utilidad en casos de mezclas complejas y en estudios de filiación cuando los individuos implicados son varones.

La limitación de este tipo de análisis reside en que, dado que el cromosoma Y no está sujeto a recombinación, es menos variable entre individuos, por lo que es necesario el análisis de muchos marcadores para obtener un alto poder de discriminación.<sup>32,33</sup>

### **3.5.3 ADN mitocondrial**

Las mitocondrias (orgánulos presentes en el citoplasma y que proporcionan la energía a la célula) se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt). Se trata de una molécula circular de 16 569 pares de bases, en la que se localizan 37 genes implicados principalmente en los procesos de fosforilación oxidativa, y que además posee una región no codificante, denominada región control o «*D-loop*». La región control presenta una gran variación entre individuos y, por tanto, es de utilidad con fines de identificación. El ADNmt se secuenció por primera vez en 1981 y hoy en día esa secuencia original, denominada de Anderson o secuencia de referencia de Cambridge, es la que se usa comúnmente como referencia con la que comparar las nuevas secuencias obtenidas.<sup>34</sup>

Una célula posee numerosas mitocondrias, las cuales a su vez contienen múltiples moléculas de ADN, por lo que en cada célula existen entre 1.000-10.000 copias de ADNmt. Este hecho, unido a que la molécula de ADNmt es circular y a su localización

en el interior de las mitocondrias (factores que lo hacen más resistente a agentes externos), hacen del ADNmt un candidato ideal para su estudio en muestras antiguas, degradadas o mínimas, así como en aquellos tejidos con muy bajo o nulo contenido en ADN nuclear, como los huesos, dientes y pelos.

El ADNmt es de herencia exclusivamente materna, es decir, se transmite de la madre a toda su descendencia ya que únicamente el óvulo aporta las mitocondrias al cigoto. Por tanto, de forma similar a lo que ocurre en el cromosoma Y, el ADNmt no es único para cada individuo, sino que éste comparte la misma secuencia con los individuos relacionados con él por vía materna. Por ello, el análisis de ADNmt es de utilidad en casos de filiación y en estudios de evolución para trazar linajes maternos. Dentro de la región control del ADNmt, existen dos regiones hipervariables principales, HV1 y HV2, que comprenden en total unas 610 pares de bases y que concentran la mayor parte de la variación entre individuos. Estas dos regiones son normalmente examinadas mediante amplificación por PCR y *secuenciación*, que consiste en la determinación de su secuencia u orden en que se disponen las bases a lo largo de ambos segmentos. Los resultados obtenidos se reflejan como las diferencias encontradas respecto a la secuencia de Anderson.<sup>35</sup> Aunque en la mayoría de los casos, todas las moléculas de ADNmt son idénticas en un mismo individuo, puede ocurrir que coexistan moléculas con alguna diferencia puntual entre ellas, fenómeno que se conoce como *heteroplasmia*.

Tanto en el análisis de marcadores del cromosoma Y como de ADNmt, la estimación de la frecuencia de un haplotipo determinado en la población general se lleva a cabo mediante conteo del número de veces que está presente ese haplotipo en una base de datos de individuos no relacionados.<sup>36</sup>

### **3.6 MÉTODOS PARA EL ANALISIS DE POLIMORFISMOS DE INTERES FORENSE**

El ADN nuclear esta presente en todas las células del cuerpo humano (excepto en los eritrocitos que carecen de núcleo), por lo que es posible extraerlo a partir de cualquier material biológico. La selección de las muestras a analizar, su toma y recogida, identificación, conservación, custodia y transporte hasta el laboratorio son factores de vital trascendencia en cualquier análisis de ADN.

En el laboratorio se procede a la extracción de ADN a partir de la muestra a analizar siendo necesario ajustar el método de extracción a las particularidades de la muestra en cuestión. Tras la cuantificación de ADN presente en el extracto se procede a su individualización, que puede llevarse a cabo principalmente mediante dos tipos de análisis.<sup>37</sup>

#### **3.6.1 FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMORFICA (RFLP)**

Los RFLP por sus siglas en ingles (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) es un método de análisis que se basa en la utilización de unas enzimas de restricción o restrictasas que funcionan a modo de tijeras moleculares y cortan el ADN de forma específica en determinadas secuencias que han reconocido previamente. Las posibles diferencias del ADN entre dos individuos hacen que, para cada marcador, el tamaño de los fragmentos de ADN generados pueda ser distinto. Los fragmentos de ADN resultantes pueden separarse en función de su tamaño mediante electroforesis en gel, que consiste en la aplicación de un campo eléctrico a una matriz gelificada sobre la que se han cargado las muestras objetos de estudio, tras su reacción de restricción. Como consecuencia de la diferencia de potencial entre ambos extremos del gel, los fragmentos más pequeños alcanzan posiciones mas adelantadas en el gel que los más grandes.

A continuación se desnaturaliza la doble cadena por inmersión en álcali (0.5 M de NaOH), se transfiere el gel de agarosa en donde se encuentran los fragmentos de

ADN a una membrana 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 (método Southern blot), se hace una detección específica para cada marcador mediante hibridación con un fragmento pequeño de ADN marcado radiactivamente (sonda unilocus), lo que revelará la posición de una banda correspondiente a un alelo determinado (si el individuo es homocigoto) o de dos bandas correspondientes (si el individuo es heterocigoto). La posición dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN y el conjunto de todos los marcadores analizados permitirá establecer el perfil genético de un individuo.

No obstante, dados los problemas de interpretación estadística de los resultados de realización de estudios poblacionales y la dificultad para la estandarización de la técnica, posteriormente se desarrollaron sistemas que generan patrones mas sencillos mediante la hibridación con varias sondas unilocus y cuyos resultados son más fáciles de interpretar, manteniendo un alto poder de discriminación.

Este método se usa para el análisis de marcadores VNTR pero presenta una serie de limitaciones que no lo hacen apropiado para el análisis de un buen número de vestigios biológicos. A parte de la complejidad y laboriosidad de esta técnica, el principal inconveniente reside en que requiere entre 100 y 200 ng de ADN y además que este no se encuentre degradado, ya que los fragmentos a analizar son de un tamaño relativamente grande.

### 3.6.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de **biología molecular** descrita en **1985** por **Kary Mullis**, (ganador de premio Nobel de Química en 1993) cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de **ADN** particular, la cual ha sido adaptada como una herramienta esencial en la investigación.<sup>8,9</sup>

Esta técnica sirve para amplificar más de mil millones de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando previamente se conozca al menos una parte de su secuencia de nucleótidos.<sup>10</sup> Tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad **virus** o **bacterias** causante de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado.<sup>11,12</sup>

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse para que vuelvan a ser duplicadas.<sup>13</sup>

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (94°C en algunos momentos) suponen la inmediata **desnaturalización** de toda proteína por lo que ya se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de **microorganismos** adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth).<sup>13,14.</sup>

Todo este proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado **termociclador**.<sup>14</sup>

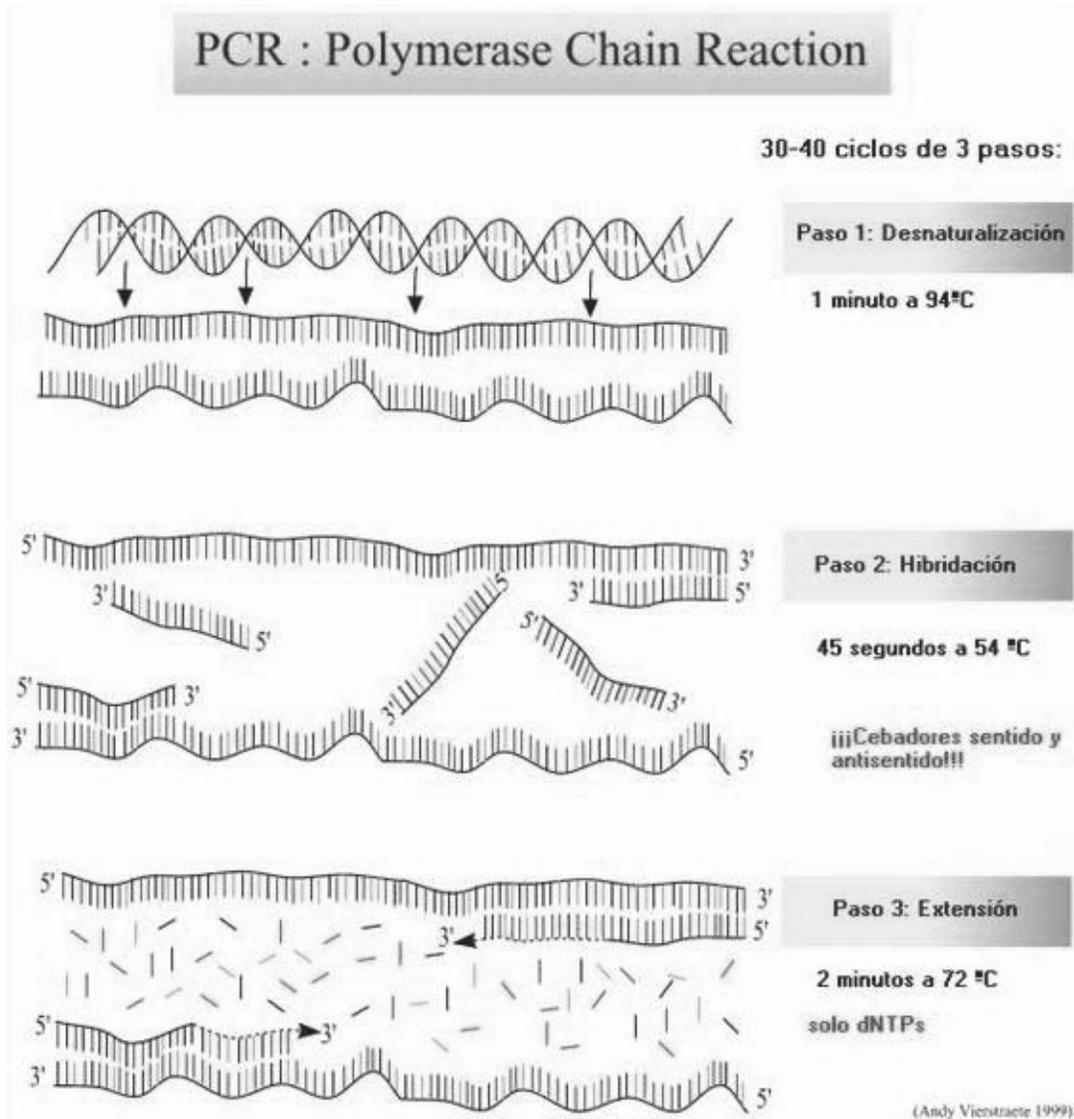
Muchos de los vestigios biológicos de interés forense presentan cantidades muy pequeñas de ADN o un ADN muy deteriorado, por lo que no son susceptibles de ser analizados mediante análisis de RLFPs. Para estos casos resulta de gran utilidad el uso de la técnica de amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa. La introducción de la PCR en la genética forense ha hecho posible el análisis de una gran variedad de muestras cuyo estudio resultaba imposible mediante las técnicas convencionales. La PCR permite la obtención *in vitro* de millones de copias de un fragmento de ADN específico a partir de una cantidad mínima de ADN (hasta picogramos) mediante una reacción enzimática cíclica.<sup>38</sup>

Los componentes básicos en una mezcla de reacción de PCR son:

- *El ADN molde* extraído a partir de la muestra objeto de análisis.
- *Primers* (par de oligonucleótidos o cebadores): Son pequeñas hebras de ADN de cadena simple de secuencia complementaria a las regiones que flanquean al segmento de ADN de interés), se requieren dos, sentido y antisentido, que mediante su unión específica al ADN molde permiten iniciar la reacción.
- *La ADN polimerasa*: La PCR requiere de una enzima polimerasa termoestable, lo cual es esencial para poder tolerar las diferentes temperaturas requeridas para la desnaturalización, hibridación y síntesis de ADN.
- *Desoxinucleótidos trifosfatos(dNTPs)*: Son los sustratos clave para que la polimerasa pueda extender los primers para dar lugar a los fragmentos amplificados.
- *Amortiguador*: Contiene 10mM de TRIS (pH 8.4), 50 mM KCl y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, el cual es el cofactor que utiliza la Taq polimerasa para su óptimo funcionamiento.

Todos los componentes son mezclados en un tubo Eppendorf e insertarse en un termociclador que permite variar la temperatura de manera automática y programable. Un proceso de PCR implica la repetición de un número determinado de ciclos, uno de los cuales consta de tres pasos.

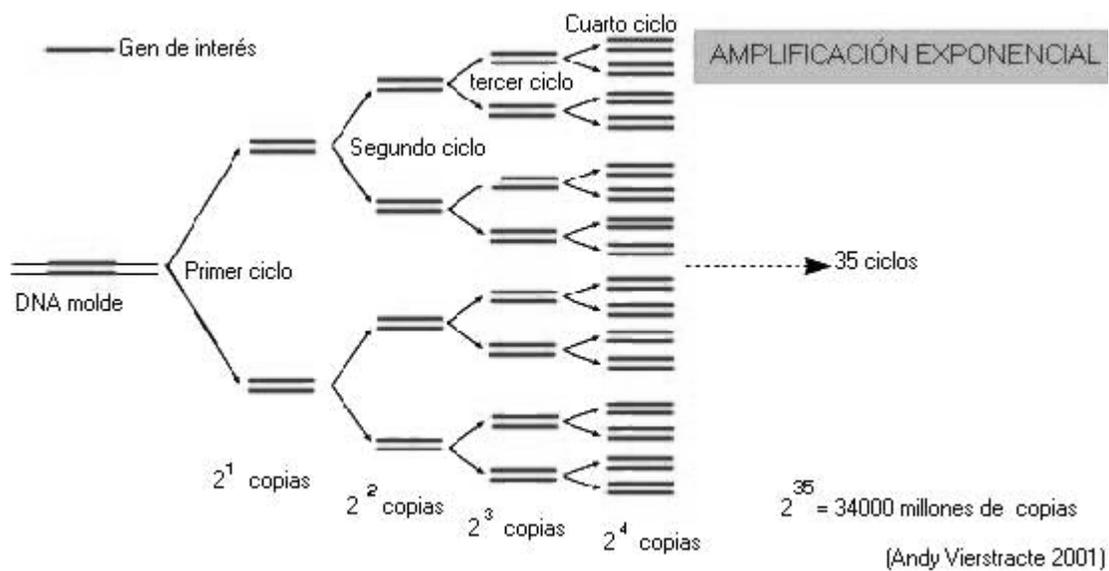
- a) Desnaturalización: Mediante la elevación de la temperatura 94-95°C las dos cadenas de la doble hélice de ADN molde se separan, quedando en forma de cadena simple.
- b) Hibridación: Al disminuir la temperatura a 50-60°C, los primers se unen al ADN molde justo en el lugar de sus secuencias complementarias.
- c) Extensión: El calentamiento a 72°C (temperatura óptima de funcionamiento de la polimerasa), permite la extensión de la cadena de ADN a partir de los cebadores mediante la adición sucesiva de nucleótidos tomando como referencia la secuencia de ADN molde.



**Fig 5.** Pasos básicos de la PCR.<sup>18</sup>

Estos pasos se repiten cíclicamente entre 25 y 35 veces, de forma que el proceso total de la reacción dura aproximadamente 3 horas. En cada ciclo se produce un incremento exponencial en el número de copias, de forma que el resultado de la reacción de PCR es la obtención de una solución con millones de copias del segmento de ADN interesado.<sup>18</sup>

La PCR se lleva a cabo en un termociclador; aparato que permite un rápido y preciso calentamiento y enfriamiento de las muestras y admite numerosas variaciones de los programas de reacción para su ajuste al análisis interesado. La separación de los fragmentos se lleva a cabo mediante electroforesis en gel o electroforesis capilar y para la estimación del tamaño se usa un estándar interno de tamaño en cada muestra. Además se requieren patrones alélicos de cada marcador que sirvan de referencia para la asignación de los alelos presentes en la muestra problema.<sup>39</sup>



**Fig 6.** Amplificación exponencial de la PCR

### 3.7 RIESGOS Y LIMITACIONES DE LA PCR

La principal ventaja de la aplicación de la PCR al laboratorio forense reside en el incremento en la sensibilidad de la técnica de individualización por ADN. No obstante, ello conlleva el inconveniente de un elevado riesgo de contaminación, ya que cualquier resto de ADN exógeno presente en una muestra es susceptible de amplificación. Por ello, desde el momento de la toma de muestra (del individuo implicado o bien del lugar de los hechos) hasta la última etapa de la amplificación en el laboratorio, es necesario seguir estrictamente una serie de precauciones que eviten la contaminación cruzada con otras muestras o con material biológico proveniente del personal implicado en la investigación.

Por ello, en un laboratorio de genética forense se precisa una separación máxima de las áreas de trabajo dedicadas a la toma de muestras, extracción de ADN, amplificación y detección de los productos amplificados, así como de los reactivos y material usado en cada etapa. La manipulación de las muestras y sus extractos de ADN debe realizarse siempre con la protección adecuada. La extracción y la amplificación de ADN deben llevarse a cabo en campanas de flujo laminar utilizando reactivos y material conveniente esterilizados. A pesar de extremar las precauciones, es necesario incluir controles positivos y negativos en la amplificación, así como disponer de los perfiles genéticos de todo el personal del laboratorio para trazar una posible contaminación por parte del profesional.

Durante la amplificación por PCR de marcadores STRs pueden originarse una serie de artefactos que pueden interferir con una clara interpretación de los resultados y cuya consideración es necesaria para garantizar un correcto genotipado. Entre los más comunes cabe citar las bandas (stutter), que son fragmentos con una o varias unidades de repetición menos que el alelo verdadero y generados por un fenómeno de tartamudeo de la polimerasa durante la amplificación. Por otra parte, la polimerasa usada en la PCR normalmente añade un nucleótido extra, generalmente adenosina, al extremo del producto amplificado, proceso conocido como *adenilación*, y que es

favorecida mediante la adición de un paso de incubación a 60°C al final del proceso cíclico de la PCR. En determinadas circunstancias puede ocurrir que esta adenilación es parcial y coexistan fragmentos adenilados y no adenilados, que se diferencian en un nucleótido de tamaño y que se detectaran como tales, lo cual puede dificultar una correcta asignación de alelos.

Existen otros fenómenos que pueden complicar el análisis de los resultados, como la detección de alelos no presentes en el patrón alélico, la no amplificación (o pérdida) de algún alelo (alelo nulo), bien por amplificación preferencial bien por la existencia de una mutación en la zona de apareamiento del cebador, o la detección de mas de dos alelos para un marcador que puede deberse a una duplicación o traslocación de la región analizada o también a una mutación parcial en la zona de apareamiento del cebador.<sup>9</sup>

### 3.8 ELECTROFORESIS

No solo las proteínas presentan carga y son solubles, también los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y, por tanto, son susceptibles de ser separados mediante electroforesis después de la amplificación por PCR. La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

Los ácidos nucleicos ya disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo, mientras que las proteínas se cargan con sustancias como el detergente SDS (dodecil sulfato de sodio), que incorpora cargas negativas de una manera dependiente del peso molecular. En los ácidos nucleicos la dirección de migración es del electrodo negativo al positivo, y esto es debido a la carga negativa presente en el esqueleto azúcar-fosfato. En los fragmentos de ADN dobles (con estructura de doble hélice) la velocidad de migración es proporcional a su tamaño. En fragmentos simples de ADN (cadena simple) y ARN, dichas moléculas tienden a plegarse de forma compleja y a migrar de forma más complicada, según la estructura terciaria formada tras el plegamiento. Sin embargo, compuestos que puedan romper los enlaces de puente de hidrógeno, como el hidróxido de sodio o formamida, son empleados para desplegar las moléculas y permitir que la velocidad de migración dependa únicamente del tamaño y no de la estructura formada tras el plegamiento. Cuando se ha completado la electroforesis, se puede revelar mediante la adición de un colorante específico para hacerlas visibles como el bromuro de etidio. Así mismo se emplean otros métodos para visualizar la separación de la mezcla en el gel. Si el reactivo es fluorescente bajo la luz UV, se puede simplemente hacer una fotografía de la placa bajo dicha luz.<sup>40</sup>

### **3.9 PROBLEMÁTICA QUE SE PLANTEA DURANTE LA RECOGIDA Y ENVIO DE MUESTRAS**

Los problemas que se plantean de forma concreta durante los procesos de recogida, mantenimiento y envío de muestras son: la contaminación biológica de origen humana, la transferencia de indicios biológicos, la putrefacción, los tratamientos físicos y químicos a los que se pueden ver sometidas las muestras.

#### **3.9.1 Contaminación biológica de origen humano**

Este tipo de contaminación se produce por la presencia, en la escena del delito o en el cuerpo de la víctima, de indicios biológicos no relacionados con los hechos y puede ser anterior o posterior a la producción de los mismos.

*La contaminación biológica anterior a los hechos* se debe a la presencia de material biológico humano previo a la producción del delito, por lo que es inevitable. Suele ser frecuente en algunos tipos de muestras (p.e. las toallas o los paños de cocina, que son muestras en las que por su propia función suelen encontrarse restos de células epiteliales, manchas de sangre, sudor... etc). Otras muestras en las que también es frecuente que exista una contaminación previa a los hechos son las tapicerías, alfombras, fundas de asientos en los coches... etc. Por ello es muy importante establecer el valor de los indicios recogidos en este tipo de muestras y de los resultados obtenidos a partir de ellos. En el cuerpo de la víctima también podemos encontrar material biológico anterior a la producción de los hechos. (p.e. es posible que personas que sufren una agresión sexual hayan mantenido relaciones consentidas previas, por lo que podemos encontrar restos de semen anteriores a la agresión).<sup>41</sup>

*La contaminación biológica posterior a los hechos* se debe al depósito de material biológico humano con posterioridad a la producción del delito, por lo que puede ser evitable. Este tipo de contaminación puede estar producida por personas ajenas a la investigación como curiosos, familiares, testigos... etc. Es relativamente frecuente ver,

en la escena del crimen, a familiares fumando o a testigos reproduciendo los hechos y tocando pruebas. Para evitarla es fundamental aislar rápidamente la escena del delito y mantener a los familiares y testigos, fuera de ella.

Sin embargo, este tipo de contaminación también puede estar producida por personas que colaboran en la investigación y que de forma accidental o por desconocimiento dejan indicios en el lugar de los hechos o en el cuerpo de la víctima. En estos casos la contaminación se debe fundamentalmente a las personas que realizan la recogida y no mantienen las mínimas precauciones como el uso de guantes (para evitar la contaminación por células descamadas de la piel), mascarillas (para evitar la contaminación por saliva al hablar o toser), material desechable de un solo uso (para evitar mezclas de fluidos)... etc., o bien, a defectos en el empaquetado de las muestras (p. e. si las muestras pertenecientes al sospechoso se envían junto con las de la víctima, habrá que extremar las precauciones para que no exista la posibilidad de una *contaminación cruzada*).

Los pelos son muestras ubicuas y muy abundantes que pueden ser introducidos en la escena del delito con anterioridad o posterioridad a la producción de los hechos. Por ello cuando se selecciona este tipo de muestra para su análisis es fundamental conocer la importancia que puede tener. Normalmente, en el laboratorio se estudian cuando no hay otros indicios biológicos que aporten datos de valor a la investigación. Además, hay que tener en cuenta que son muestras en las que el porcentaje de éxito en la extracción de ADN nuclear es bajo y con frecuencia hay que recurrir a técnicas más complejas como el ADN mitocondrial.

La transferencia de indicios biológicos es normalmente accidental, lo que puede dar lugar a una contaminación o puede ocasionar la pérdida de una prueba. Los indicios biológicos que sufren con más facilidad este cambio de localización son los pelos.<sup>42,43</sup>

### 3.9.2 Putrefacción de las muestras

Este proceso tiene lugar por el desarrollo de microorganismos que degradan los indicios biológicos. Suele estar favorecida por las condiciones de humedad y altas temperaturas y es problemática porque produce la degradación del ADN.

Los procesos de putrefacción pueden ser:

Inherentes a la propia muestra por efecto de la antigüedad o de las condiciones ambientales, o provocados por un defecto en el empaquetamiento y conservación de las muestras durante periodo de mantenimiento y envío al laboratorio, lo que puede ser evitable. Las muestras más sensibles a este tipo de contaminación son las que contienen indicios húmedos (p. e. ropas de vestir o del hogar con grandes manchas de sangre o de orina), los fluidos biológicos que son recogidos con hisopos secos (p. e. tomas de saliva, tomas vaginales, tomas anales... etc.) o los hisopos humedecidos que son utilizados para recoger manchas secas en el lugar de los hechos y en el cuerpo de la víctima (p. e. manchas de semen, saliva en marcas de mordeduras...etc.). Para evitar la putrefacción es necesario dejar las muestras secar a temperatura ambiente, en un lugar protegido y una vez secas introducirlas en bolsas de papel o cajas de cartón para su envío.

También son susceptibles a este tipo de contaminación los indicios líquidos (sangre, orina, líquido amniótico... etc.) y los órganos y restos de tejidos blandos. Este tipo de muestras deben mantenerse y enviarse refrigeradas al laboratorio, para evitar que se establezcan o desarrollen los procesos de putrefacción.<sup>44</sup>

### 3.9.3 Utilización de tratamientos físicos y/o químicos

La utilización de tratamientos físicos y/o químicos puede dificultar algunos de los procesos del análisis genético, fundamentalmente los procesos de amplificación y extracción de ADN.

Estos tratamientos pueden ser:

*Inherentes a la propia muestra*, cuando el producto químico forma parte del soporte o sustrato donde cae la mancha (p. e. tintes, colorantes, pinturas, esmaltes, aceites... etc.) o bien, cuando las muestras son sometidas a la acción de productos químicos (p. e. ropas lavadas con lejías y detergentes) en estos casos suele ser inevitable, salvo que la mancha afecte a distintos soportes y haya posibilidad de seleccionar alguno que no haya sufrido este tipo de tratamientos.

*Provocados* cuando las muestras se envían inmersas en productos conservantes (p. e. órganos en formol, tomas vaginales recogidas con hisopos en medio de mantenimiento... etc.) o han sido tratadas con productos (p. e. la utilización de reveladores de huellas dactilares) que pueden afectar al análisis de los indicios biológicos. En este sentido, hay que insistir en que *el formol* produce una intensa degradación del ADN, aunque este poco tiempo (menos de 24 horas) en contacto con las muestras. Por ello siempre que sea posible debe evitarse la fijación con formol o con soluciones que lo contengan como el Bouin o el Zenker.<sup>45</sup> Si por algún motivo las muestras dedicadas al análisis genético tuviesen que estar fijadas, se recomienda una fijación en etanol.

También se debe tener cuidado con los sistemas de luz UV utilizados para la detección de manchas, ya que la luz UV se utiliza para descontaminar las superficies y material empleados entre los procesos de extracción y amplificación de ADN<sup>46,47</sup>. Por ello, siempre que se realice algún estudio previo que implique cualquier tipo de tratamiento físico o químico que pueda comprometer el análisis de ADN es conveniente comunicarlo, para valorar cómo puede afectar al análisis.

#### **4. PRECAUCIONES GENERALES DURANTE LOS PROCESOS DE RECOGIDA Y ENVÍO DE MUESTRAS.**

Se deben adoptar medidas básicas para proteger tanto a la muestra como al personal encargado de realizar los procesos de recogida y envío de muestras. Siempre que se manipula material biológico es prudente asumir que este tipo de material puede ser una posible fuente de infección y contener patógenos peligrosos.

*Las precauciones básicas que deben adoptarse para la protección del personal son:*

- Usar guantes, cubrebocas y ropa protectora.
- Utilizar material desechable y cuando sea posible estéril.
- Evitar comer, beber y fumar en las zonas de recogida de muestras.

*Las precauciones básicas que deben adoptarse para la protección de la muestra son:*

- Utilizar instrumental desechable (guantes que deben cambiarse con frecuencia).
- Evitar hablar, toser o estornudar sobre las muestras. Usar cubrebocas siempre que sea posible.
- Usar bata y otro tipo de ropa protectora (gorro, calzas... etc.) cuando sea necesario.
- Dejar las muestras secar a temperatura ambiente, en un lugar protegido, antes de empaquetarlas para su envío definitivo al laboratorio. No utilizar aire caliente ni dejar secar las muestras al sol.
- Empaquetar las muestras en bolsas de papel, evitando utilizar plástico.
- Empaquetar las muestras por separado, en recipientes etiquetados, de cierre irreversible o en doble envase. Separar las muestras de distinto origen, víctima y sospechoso.
- No añadir conservantes cuando las muestras sean para estudios de identificación genética.
- Una vez terminada la recogida de muestras, guardar todo el material desechable utilizado (guantes, pipetas, papeles...) en bolsas de basura o contenedores, para eliminarlo posteriormente siguiendo las normas de destrucción de residuos vigentes en cada Centro.<sup>43,48</sup>

#### **4.1 GESTIÓN DE MUESTRAS Y CADENA DE CUSTODIA**

Se denomina gestión de muestras a todos los procesos que conlleva la manipulación de las muestras desde su toma hasta su destrucción, y cuyo control asegura su integridad y fiabilidad. Mientras que la cadena de custodia es el conjunto de documentos escritos donde queda registrada la gestión de las muestras desde su toma hasta su destrucción.

En estos documentos deben quedar bien reseñadas todas las manipulaciones que se realizan sobre las muestras y quien las realiza. Por ello, tanto en los formularios como en los recipientes debe existir un apartado dedicado a la cadena de custodia en los que debe constar, al menos: El nombre o identificación de la persona que realiza la recogida y su firma. La fecha y hora (si es necesario) en que se realiza la recogida.<sup>3-6</sup> Así como todo el tiempo que dure el análisis en el laboratorio e incluso después del mismo, comunicando al juzgado solicitante, las características de la conservación de las muestras biológicas (tiempo de almacenaje de la muestra biológicas y/o de sus extractos de ADN, así como la temperatura de conservación y personas que manipulan o intervienen en el análisis) incluso después de haber finalizado el estudio.<sup>48</sup>

## 4.2 BASE DE DATOS CON FINES DE INVESTIGACION FORENSE

Las bases de datos de ADN con fines de investigación criminal son actualmente las bases de datos genéticas de mayor interés para los laboratorios forenses. Gracias a la experiencia acumulada por un gran número de países en todo el mundo (que ya han desarrollado una legislación específica) hoy sabemos que el sistema automatizado de los perfiles de ADN estructurados en Bases de Datos de ADN pueden ser comparados por este medio.

Por otro lado, las bases de datos poblacionales de marcadores de ADN humanos utilizados en genética forense (muchas de ellas públicas y accesibles por Internet) se han convertido en una herramienta esencial para poder realizar una evaluación bioestadística adecuada del valor de la prueba del ADN, tanto de marcadores STR autosómicos como de datos haplotípicos (Y-STR o mtDNA).

La mayoría de los países han desarrollado ya o están en vías de desarrollar bases de datos de ADN con fines de investigación criminal en las que se estructuran fundamentalmente dos índices de búsqueda. Por un lado, un índice de perfiles de ADN anónimos obtenidos de vestigios biológicos de la escena del delito, y por otro lado, un índice de perfiles de ADN obtenido de individuos que son sospechosos o condenados (según las distintas legislaciones) en una causa penal. La búsqueda de coincidencias entre los distintos perfiles de ADN en el índice de vestigios anónimos puede revelar la presencia de un mismo perfil en distintas escenas del delito, lo que permite relacionar distintos delitos con un mismo individuo.

La búsqueda de coincidencias de los perfiles de ADN del índice de vestigios anónimos con los perfiles de ADN del índice de sospechosos o condenados permite obtener un dato primario de identificación de la procedencia individual del vestigio.<sup>49,50</sup>

## 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el ámbito criminalístico se buscan herramientas del campo de la bioquímica que permitieran identificar individuos mediante muestras y evidencias biológicas, además de las huellas dactilares; utilizando la PCR que es una técnica muy confiable para la identificación del genoma humano. Sin embargo esta técnica no tiene la relevancia que debiera de tener ya en la cuestión legal, debido a que se cuestiona mucho todo el procedimiento que se lleva a cabo desde el momento que se toma la muestra, el levantamiento y su manejo en el desarrollo de esta técnica.

La PCR es de gran importancia ya que se utiliza para hacer millones de copias exactas del ADN de una muestra biológica. La capacidad de amplificación del ADN mediante esta técnica permite el análisis de ADN en las muestras biológicas tan pequeñas como algunas células de la piel, e incluso con muestras altamente degradadas. Con la PCR, se marca otra etapa dentro de la genética forense ya que esta técnica presenta una sensibilidad y alto grado de especificidad, al ser aplicada al indicio biológico, logrando hoy en día hasta un nanogramo ( $1 \times 10^{-9}$ g) y obtener perfiles genéticos, por lo que es importante aislar las áreas de trabajo y evitar contaminaciones.

Con la aplicación de la PCR en las ciencias forenses, se puede obtener una base de datos genética de referencia, para establecer la identidad con una confiabilidad del 99.99%, valor que se acepta hoy en día por diferentes organismos internacionales bajo marco de procesos de calidad certificados dentro del ámbito forense.

## 5. OBJETIVO

- Demostrar la importancia de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de personas involucradas en la comisión de un delito.

## 7. METODOLOGÍA

La búsqueda bibliográfica se llevó a cabo en Bibliotecas y vía Internet bajo los siguientes criterios:

- Libros relacionados con el tema
- Revistas de carácter científico
- Internet, en páginas de la base de datos de la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM.

Para el desarrollo de la tesis se recopiló información bibliográfica que procede principalmente de México y Estados Unidos.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La tecnología del ADN es en la actualidad una herramienta imprescindible en la investigación y resolución de casos en el ámbito forense, ya que se tiene la certeza de identificar al culpable y de excluir a personas que han sido falsamente asociadas con una muestra biológica relacionada con un delito, pero su eficacia depende de que se haya realizado una cuidadosa identificación de los vestigios en el lugar de los hechos (escena del crimen), en el sospechoso y en la víctima, como también en su recogida, empaquetado y envío al laboratorio en condiciones que preserven su integridad, para que no se deterioren ni contaminen, asegurando la cadena de custodia hasta su llegada al laboratorio ya que de todos estos procesos depende la admisibilidad de la prueba ante los Tribunales de Justicia.

No solo la fase preanalítica es importante para proceder al inicio de la prueba pericial, si no también toda la etapa analítica en la que se lleva a cabo la PCR, la cual debe cumplir requisitos fundamentales debido a su alta sensibilidad, sin los cuales la prueba podría carecer de valor ante los tribunales, por posibles errores técnicos que la invalidarían.

Debido a la importancia de la PCR en el ámbito legal hay dos cuestiones que son fundamentales, una contar con los medios materiales y necesarios para realizar este proceso de una manera óptima y la otra es que los especialistas encargados de llegar al lugar de los hechos tengan un buen conocimiento y una buena formación sobre el tema, por lo que es prioritario la organización de cursos, seminarios... etc., para poder realizar de una forma adecuada el proceso de recogida de muestras y lo que ello conlleva.

## 9. CONCLUSIONES

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica con alta confiabilidad para la obtención de perfiles genéticos, ya que solo se necesita una mínima cantidad de indicio biológico, e incluso muestras muy degradadas como son los cadáveres para llevar a cabo esta prueba.

La aplicación de la PCR en el ámbito legal es de suma importancia ya que se tiene la seguridad de obtener el perfil genético del autor o autores de un delito, cabe mencionar que esta técnica en conjunto con las técnicas policíacas usuales se utilizan para que finalmente se lleve a cabo un proceso legal justo.

Otro beneficio de la PCR es que ayuda a la elaboración de perfiles de ADN estructurados en base de datos genéticos, para ser comparados sistemáticamente, la cual es un elemento de trabajo muy eficaz para reducir el índice de criminalidad de determinados delitos sin autor conocido y, especialmente aquellos en los que existe una alta residencia.

Esta técnica no solo se encarga del reconocimiento de personas a fin de brindar apoyo en la procuración e impartición de justicia, si no también se utiliza en casos para la identificación de personas desaparecidas, investigación de paternidades, huella genética, diagnóstico de enfermedades hereditarias, clonación de genes, análisis de ADN fósil, genotipado de mutaciones específicas, identificación de especies, etc., debido a la utilidad de la PCR se debe tomar en cuenta la importancia de las muestras biológicas en cada una de las fases del desarrollo experimental ya que de esos pasos depende la buena marcha de la investigación.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Kirby LT., DNA Fingerprinting. Stockton Press, New York.1990:375.
- 2.Georges M., Lathrop M., Hilbert P., et al. On the use of DNA Fingerprints for Linkage Studies in Cattle. Genomics 1990; 6:461-474.
- 3.Schiro G., Collection and Preservation of Evidence, Louisiana State Police Crime Laboratory.1998.
- 4.Commission on Peace Officer Standards and Training's workbook for the Forensic Technology for Law Enforcement Evidence. Colletion Guidelines. California. 1998.
- 5.Evidence Examination-DNA general, Handbook of Forensic Services 1999.
- 6.Trace Evidence Recovery Guidelines, SWGMAT Evidence Committee, Forensic Sci. Comm.1999; 1: 3.
- 7.Martínez M.B., La Prueba del ADN en Medicina Forense. Ed. Masson S.A., Barcelona. 1999.
- 8.Anderson J., Quantification of DNA by Slot-blot Analysis. Methods Mol. Biol 1998; 98:33-8.
- 9.Mullis K., Faloona F., Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction. Methods Enzimol 1987; 155:335-350.
- 10.Waye J.S., Presley L.A., Budowle B., et al. A Simple and Sensitive Method for Quantifying Human Genomic DNA in forensic specimen extracts. Biotechniques 1989; 7(8):852-5.
- 11.Witwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P., Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. Biotechniques 1997; 22(1):130-1, 134-8.
- 12.Richard M.L., Frappier R.H., Newman J.C., Developmental Validation of A real-time Quantitative PCR Assay for Automated Quantification of Human DNA. J Forensic Sci 2003;48(5):1041-6.
- 13.Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H., Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 50-30 Exonuclease Activity of Thermus Aquaticus DNA Polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(16):7276-80.
- 14.Lee L.G., Connell C.R., Bloch W., Allelic discrimination by Nick-translation PCR with Fluorogenic Probes. Nucleic Acids Res 1993; 21(16):3761-6.

15. McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R., PCR vol.1 A Practical Approach. Oxford University. New York. 1991.
16. Watson J.D., Crick F.H. Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Eoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.
17. Tyagi S., Kramer F.R., Molecular Beacons: Probes that Fluoresce Upon Hybridization. *Nat Biotechnol* 1996; 14(3):303–8.
18. Livak K.J., Allelic Discrimination Using Fluorogenic Probes and the 5´ Nuclease Assay. *Genet Anal* 1999; 14: 143-149.
19. Carpi A., Ácidos Nucleicos: DNA y RNA, Visionlearning 2003; Vol. BIO-1 (1s).
20. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome. *Nature* 2004; 431: 931-945.
21. Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., et al. Creation of Human Tumor Cells with Defined Genetic Elements. *Nature* 1999: 464-468.
22. Sherry S.T., Ward M., Sirotkin K., dbSNP-Database for Single Nucleotide Polymorphisms and Other Classes of Minor Genetic Variation. *Genome Res* 1999; 9: 677-679.
23. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., et al. dbSNP: The NCBI Database of Genetic Variation. *Nucleic Acid Res* 2001; 29:308-311.
24. Collins F.S., Guyer M.S., Charkravarti A. Variations on a theme: Cataloging Human DNA Sequence Variation. *Science* 1997;278:1580-1581.
25. Botstein D, Risch N., Discovering Genotypes Underlying Human Phenotypes: Past Successes for Mendelian Disease, Future Approaches for Complex Disease. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 228-237.
26. Lin M.T., Storer B, Martin P.J., et al. Relation of an Interleukin-10 Promoter Polymorphism to Graf-versus-host Disease and Survival after Hematopoietic-cell-transplantation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2201-2210.
27. Betticher D.C., Thatcher N., Altermatt H.J., et al. Alternate Splicing Produces a Novel Cyclin D1 Transcript. *Oncogene* 1995; 11: 1005-1011.
28. Duan J, Wainwright M.S., Cameron J.M., et al. Synony – mous Mutations in the Human Dopamine Receptor D2 (DRD2) Affect mRNA Stability and Synthesis of the Receptor. *Hum Mol Genet* 2003; 205-216.
29. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. Characterization of Single Nucleotide Polymorphism in Coding Regions of Human Genes. *Nat Genet* 1999; 22: 231-238.

- 30.Crawford DC, Nickerson DA. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annu Rev Med* 2005; 56: 303-320.
- 31.Weber JL, Wong C., Mutation of Human Short Tandem Repeats. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1123-1128.
- 32.Gill P., Brenner C., Brinkmann B., et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on Forensic Analysis Using Y-chromosome STRs. *Int. J. Legal Med* 2001. 114: 305-309.
- 33.Bar W., Brinkmann B., Budowle B., et al. DNA Recommendations. Further Report of the DNA Commission of the ISFH Regarding the Use of Short Tandem Repeat Systems. *Int. J. Legal Med* 1997. 110: 175-176 and *Forensic Sci. Int.* 87: 181-184.
- 34.Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., et al. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.
- 35.Carrecedo A., Lincoln P., Mayr W., et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for Mitochondrial DNA Typing. *Forensic Sci Int* 2000. 110: 79-85.
- 36.Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., et al. Mitochondrial DNA Sequence Heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov Establishes the Authenticity of the Remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet* 1996; 12: 417-420.
- 37.Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., et al. Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnostic of Sickle Cell Anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
- 38.O'Connell Joe. RT-PCR Protocols. Humana Press INC. New Jersey. 2002:23-25.
- 39.Butler JM. Forensic DNA Typing. Biology and Technology behind STR Markers. Academic Press. 2001.
- 40.Krause U., Thomson T.H., Pennington. Molecular Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Comparison with That by Bacteriophage Typing. *J.Clin. Microbiol* 1996; 34: 959-961.
- 41.Schiro G., Special Consideration for Sexual Assault Evidence. Louisiana State police Crime Laboratory, 1998.
- 42.Gaudette B.D, et al. A Secondary Transfer of Human Scalp Hair, *J Forensic Sci* 1987; 32: 1241-1253.
- 43.Lee H.C., et al. Forensic Application of DNA Typing. Part 2: Collection and Reservation of DNA Evidence, *Am J Forensic Med Pathol* 1998; 19:10-18.

44.Hochmeister M., et al. A foldable Cardboard Box for Drying and Storage by Cotton Swab Collected Biological Samples, *Ach Kriminol* 1997:18.

45.Greer CE, et al. Sample Preparation and PCR Amplification from Paraffin Embedded Tissues, *PCR Methods App.* 1994; 3: S113-S122.

46.Springer E., et al. Detection of Dry Body Fluids by Inherent Short Wavelength UV Luminiscence: Preliminary Results, *Forensic Sci Inter*, 1994; 66: 89-94.

47.Kwok S, et al. Avoiding False Positives with PCR, *Nature*, 1989; 339: 237.

48.Fernández L., Actualización Práctica y Revisión de las Normas de Preparación y Remisión de Muestras para Análisis en el Instituto Nacional de Toxicología. Sección de Biología, Plan de Formación continuada 2001 para Médicos Forenses, Madrid, Ministerio de Justicia, Centro de Estudios Jurídicos de la Administración de Justicia 2001:453-464.

49.Scheneider P.M., The Current Situation with National DNA Databases in Europe. Presentación Oral en el XX Congreso de la ISFG Celebrado en Arcachon. Francia 2003.

50.Asplen C.H., International Perspectives on Forensic DNA Databases. ISRCL Conference. La Haya 24-28 Agosto 2003.

## GLOSARIO

**ADN mitocondrial:** ADN circular que se encuentra en el interior de las mitocondrias.

**ADN molde:** ADN del que se pretende obtener múltiples copias de un determinado segmento.

**ADN nuclear:** ADN que se encuentra en el interior del núcleo celular formando parte de los cromosomas.

**Alelo:** variantes que pueden estar presentes en un locus determinado.

**Cebador:** fragmento corto de ADN de cadena simple que ligado a la cadena de ADN complementaria permite a la polimerasa extender una nueva cadena de ADN.

**Cromosoma:** estructura muy compacta que en humanos está constituida por ADN y proteínas.

**Delección:** mutación que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN.

**Desnaturalización:** separación de las dos cadenas complementarias de una molécula de ADN.

**Diploide:** estado en el que una célula posee doble dotación cromosómica, formada por parejas de cromosomas homólogos (células somáticas).

**Electroforesis:** técnica que permite la separación de moléculas de distinto tamaño cargadas en una matriz mediante la aplicación de un campo eléctrico.

**Enzima de restricción:** enzima que funciona como una «tijera molecular» cortando el ADN de forma específica en determinada secuencia que ha reconocido previamente.

**Gen:** segmento de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o de un ARN (ácido ribonucleico).

**Genoma:** contenido total de ADN en una célula.

**Haploide:** estado en el que una célula posee una única dotación cromosómica, gametos (óvulo y espermatozoide).

**Haplotipo:** combinación de genotipos de diferentes loci que se heredan en bloque.

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

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

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

**Homocigoto:** individuo que para un locus determinado presenta en ambos cromosomas homólogos el mismo alelo.

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

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

**Nucleótido:** unidad química de la molécula de ADN de cadena simple constituida por un azúcar, un fosfato y una base nitrogenada.

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

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

**Polimerasa de ADN:** enzima capaz de sintetizar una cadena doble de ADN.

**Polimorfismo:** variación en el ADN entre individuos de una misma especie.

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

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

**Secuencia repetida en tándem:** región de ADN repetitivo constituida por una secuencia determinada que se repite consecutivamente, una detrás de la otra, un número variable de veces.

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

**STR (*Short Tandem Repeats*):** unidad de repetición de 2 - 6 nucleótidos.

**VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*):** unidad de repetición de 7-100 nucleótidos.