



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



“Lineamientos para la recolección de muestras biológicas para el análisis forense del ADN”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGICO
PRESENTA**

NORMA ESTHER CEDILLO DIAZ

**A S E S O R
M. en C. VALENTIN ISLAS PÉREZ**

MÉXICO, D. F.

ENERO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“D E D I C A T O R I A S”

Con todo mi agradecimiento y respeto a mis padres:

ROSALIO Y ENEYDA

Quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todos sus desvelos y todo su amor hacia mi.

Con amor a mis hermanos:

JAVIER, BETY, JUANA, ROSA Y DAVID

Por su apoyo, comprensión y ayuda incondicional, además por estar siempre conmigo y compartir este gran anhelo de mi vida.

Con todo mi cariño incondicional a mis hijos:

SALMA Y ANDRE

Por ser los hijos más lindos y comprensivos, por su apoyo y paciencia en los días difíciles y por ser el estímulo más grande de mi vida

Con todo mi amor a mi esposo:

SAUL

Por ser siempre la persona que esta a mi lado en los buenos y malos momentos, porque con su apoyo, paciencia y comprensión logré una de las metas más importantes de mi vida,

A mi asesor:

M. EN C. VALENTIN ISLAS PÉREZ

Por su apoyo, comprensión e invaluable colaboración para la realización de este trabajo.

A mis amigos:

QFB. ROSALBA BARRERA M., QFB. JESUS ARROYO R., Y QFB. CAROLINA JIMENEZ

Por su apoyo y constante estímulo para salir adelante con este trabajo.

I N D I C E

Introducción.....	1
Marco teórico.....	3
Objetivos.....	8
Capitulo 1 Generalidades de la criminalistica	9
1.1 Criminalística.....	9
1.2 Clasificación.....	9
1.3 Método de criminalística.....	10
1.4 Cadena de custodia.....	10
1.5 Lugar de los hechos.....	11
1.6 Indicios.....	11
1.6.1 Clasificación de los indicios.....	11
1.7 Técnicas.....	13
Capitulo 2 Consideraciones Generales	14
2.1 Estructura del ADN.....	14
2.2 Clasificación del ADN.....	15
2.3 Función del ADN.....	16
2.4 Utilización de restos orgánicos utilizados para identificar el ADN de una persona.....	16
Capitulo 3	
3.1 Técnicas para el estudio del ADN.....	18
A) FLPs (Fragmentos de restricción de longitud polimórfica).....	18
B) VNTR (Variable number of tandem repeat).....	18
C) STR (Repeticiones cortas en tándem).....	19
D) Souther blot.....	19
E) PCR (Reaccion en cadena de la polimerasa).....	19
Capitulo 4 La importancia de los indicios en el lugar de los hechos	25
Capitulo 5 Aislamiento y evaluación de los riesgos de contaminación del ADN	27
5.1 Contaminación anterior o previa.....	28
5.2 Contaminación coetánea o paralela.....	29
5.3 Contaminación posterior.....	30
5.4 Contaminación posterior accidental.....	30
5.5 Contaminación posterior negligente.....	31
5.6 Contaminación posterior criminal.....	31
Capitulo 6	32
Consideraciones preliminares para la recolección de muestras e indicios de naturaleza biológica.....	32
Capitulo 7 Generalidades de los indicios	34
Generalidades de los indicios.....	34
7.1 Sangre.....	34
7.2 Semen.....	34
7.3 Pelo.....	36

7.4 Piel.....	37
7.5 Saliva.....	38
Capitulo 8	
Recolección y preservación de los diferentes tipos de muestras.....	39
8.1 Normas generales de recolección.....	39
8.2 Sangre.....	40
8.3 Semen.....	43
8.4 Tejidos, órganos, dientes y huesos.....	45
8.5 Saliva.....	46
8.6 Manchas de fluidos.....	46
8.7 Pelo.....	47
Capitulo 9 Preservación de muestras	
Preservación de muestras.....	48
Conclusiones.....	50
Anexo.....	51
Bibliografía.....	54

INTRODUCCIÓN

El desarrollo social trajo consigo una modificación de la tipología delictiva, que ha hecho relativamente frecuente determinados tipos de actos criminales caracterizados por su violencia con una notable desproporción de fuerza entre víctima y agresor, por 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 profundizado en su capacidad identificadora sobre indicios cada vez más pequeños: el máximo exponente en el momento actual es la denominada tecnología del ADN.

La aplicación forense de los métodos de tipificación del ADN durante los últimos veintitrés años ha constituido un avance notable en la evaluación de evidencias biológicas. Con su gran sensibilidad y poder de discriminación, el análisis del ADN se ha vuelto un área importante en el campo de las ciencias forenses, y pruebas de paternidad. Para ello las muestras más comunes son sangre, semen y/o manchas de ambos.¹

El análisis del ADN promete ser la herramienta más importante en la identificación humana desde que Francis Galton desarrolló el uso de las huellas dactilares para el mismo propósito. Se puede predecir que en un futuro no distante será posible identificar a una persona con una certidumbre científica que está más allá de la duda razonable, incluso en problemas que actualmente se presentan como un desafío para la tecnología con la que cuentan los laboratorios de genética forense, tanto en la mezcla de fluidos biológicos como en el caso de violaciones tumultuarias o bien, discernir entre gemelos idénticos.

Como ya fue citado anteriormente la identificación de perfiles genéticos es una técnica que aparece a mediados de los 80s y se considera como una metodología relativamente joven. Sin embargo, como en muchas otras áreas de la ciencia, ésta en particular ha tenido un enorme desarrollo en muy corto tiempo, desde la aplicación de la "huella genética" hasta la implementación de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y el análisis de los STRs (Repeticiones cortas en tándem) han aparecido en la literatura científica una infinidad de investigaciones y desarrollo de tecnología.²

Aunque existe bastante información existente sobre el tema, la comisión de errores en la toma de muestra, el embalaje y el envío al laboratorio, hacen necesario y urgente difundir información básica de este tema con el fin de obtener una muestra de calidad analítica, para el análisis de ADN.

Es importante que toda persona involucrada en esta fase de la investigación la conozca.

Por ello, la finalidad de éste trabajo es elaborar una guía sobre los lineamientos mínimos necesarios para la recolección de las muestras más comúnmente utilizadas en el análisis forense de ADN, como una parte del control de calidad interno en la etapa pre analítica.

MARCO TEORICO

Antecedentes Históricos

Evolución de las técnicas de estudio del ADN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) ha adquirido gran importancia en la investigación científica de hechos delictivos, ya que el estudio pericial de material biológico encontrado en el lugar de los hechos, ha contribuido principalmente en la identificación inequívoca de probables responsables o reconocimiento de víctimas o personas que por otros medios resultaría imposible realizar.

El análisis se lleva a cabo mediante técnicas especializadas para extraer, purificar, multiplicar y comparar el ADN que se encuentra en los materiales biológicos que se presenta para estudio. Sin embargo, uno de los problemas que se presentan con mayor frecuencia es la recolección y manipulación de las muestras biológicas, ya que éstas pueden ser contaminadas o destruidas con facilidad, lo cual trae como consecuencia que el análisis no se concluya apropiadamente y el éxito de la prueba se vea frustrado por utilizar técnicas inapropiadas en el manejo del ADN durante esta etapa.³



La Hemogenética Forense nace a principios de siglo, cuando Karl Landsteiner describe el sistema ABO de los hematíes y Von Dürgen y Hirschfeld descubren su transmisión hereditaria. Esta ciencia surgió como una rama de la Criminalística cuyo objetivo era la identificación genética tanto en casos de investigación criminal

como en estudio biológico de la paternidad. Inicialmente, las investigaciones se centraban en el estudio de antígenos eritrocitarios (sistema ABO, Rh, MN), proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y sistema HLA. Con el estudio de dichos

marcadores podía incluirse o excluirse una persona como posible sospechoso por poseer una combinación genética igual o diferente a la del vestigio biológico hallado en el lugar de los hechos.

Pero fue a mediados de siglo cuando gracias al descubrimiento del ADN y de su estructura y al posterior avance de las técnicas de análisis de dicha molécula, la Hemogenética Forense evolucionó considerablemente hasta el punto de que hoy en día puede hablarse de una especialidad dentro de la Medicina Forense: la Genética Forense. Dicha ciencia estudia básicamente unas regiones polimórficas del ADN, así analizando un determinado número de dichas regiones, la probabilidad de que dos individuos sean genéticamente iguales es prácticamente nula (excepto en el caso de gemelos univitelinos).

Aunque la ciencia tenía los conocimientos necesarios para el estudio del ADN, su aplicación en la resolución de casos judiciales no se produjo hasta 1985, cuando el Ministerio del Interior británico solicitó la ayuda de Alec J. Jeffreys, profesor de Genética de la Universidad de Leicester. Los primeros casos de Criminalística fueron resueltos gracias a la técnica de RFLPs (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). Jeffreys descubrió la existencia de unas regiones minisatélites hipervariables dispersas por el genoma humano que al ser tratadas con enzimas de restricción generaban fragmentos de longitud variable.

Estudios posteriores realizados por el mismo Jeffreys demostraron que las diferencias en el tamaño de estos fragmentos se debían a que estas regiones consistían en un determinado número de repeticiones en tándem de una secuencia central, el cual variaba de unos individuos a otros.⁴

El primer locus de ADN polimórfico fue descubierto por Gimán y White en 1980 usando una sonda de ADN arbitraria, de esta manera observaron fragmentos de más de 15 longitudes diferentes en una pequeña muestra de individuos. Posteriormente se encontraron otros loci hipervariables como en la secuencia del gen de la insulina humana, en el oncogen "ras", en el pseudogen de la zeta-globina y en el gen de la mioglobina. Estos loci hipervariables constaban de repeticiones en tándem de una secuencia de oligonucleótidos (11 a 60 pb), de manera que las diferentes longitudes de los fragmentos originados dependían del número de dichas repeticiones y se les denominó VNTR (variable number of tandem repeat)

Tras el descubrimiento de los primeros VNRTs se vio que éstos podían ser aplicados a la medicina forense y sustituir a los marcadores clásicos. En un principio la manera de estudiar dichos marcadores se hizo por medio de la técnica llamada hibridación con sondas o Souther blot.

El tipo de sondas utilizadas en esta técnica pueden ser de dos tipos:

Sondas Mono-Locus (SLP): Son específicas para una región de un determinado cromosoma. Se unen a secuencias largas de nucleótidos y presentan mayor

variabilidad que las sondas multi-locus. Como resultado se observan una o dos bandas por individuo, según sea homocigoto o heterocigoto. El patrón de bandas obtenido con estas sondas se denomina perfil unilocus de ADN o “DNA profiling”

Sondas Multi-locus (MLP): Hibridan con secuencias minisatélites presentes en varios loci de diferentes cromosomas. Son sondas de 10 a 15 nucleótidos que se repiten múltiples veces y tras el revelado se observan de 10 a 20 bandas por persona. Este patrón de múltiples bandas se conoce como huella genética multilocus o DNA fingerprint”.⁵

Las ondas multi y mono-locus presentan una serie de ventajas e inconvenientes con respecto a una serie de parámetros como son:

- Información aportada: las sondas multi-locus tienen una mayor capacidad discriminativa al aparecer múltiples bandas. No obstante, las mono-locus son más específicas ya que el fragmento de ADN con el que hibridan es de mayor tamaño.
- Cantidad y calidad del ADN: cuando se usan sondas multi-locus se requiere aproximadamente un microgramo de ADN sin degradar mientras que en el caso de las mono-locus se necesita menos de 100 ng y este ADN no necesariamente debe estar en perfecto estado, siempre y cuando el fragmento complementario a la sonda esté intacto.
- Especificidad entre especies: las sondas multi-locus permiten su uso sobre el ADN humano y cientos de animales superiores, mientras que las mono-locus son exclusivas de ADN humano.

A pesar de que el análisis SLP ha sido y es bastante útil en estudios de paternidad no puede decirse lo mismo de su aplicación a la criminalística ya que presenta una serie de inconvenientes como son:

- La cantidad de ADN que se necesita está entre 20 y 100 ng, cantidad difícil de conseguir en casos de criminalística en los que los indicios biológicos encontrados son mínimos.
- En cuanto a la calidad del ADN, en la práctica forense es muy difícil encontrar en estado no degradado toda la cantidad de ADN que se necesita para un análisis con sondas mono-locus.
- El tiempo requerido para este tipo de análisis es de dos o tres días.
- El hecho de que se requieran cantidades elevadas de ADN hacen que normalmente, con el primer análisis se consume la totalidad de la muestra, con lo que se dificulta una posterior revisión del caso.

Todas estas limitaciones fueron superadas gracias a la aplicación en genética forense de una técnica, la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), que supuso una revolución en muchos campos de la biología y de la medicina.⁶

El estudio de indicios biológicos por PCR ha permitido la resolución de un gran número de casos en criminalística que hasta entonces eran desestimados por no poseer la suficiente cantidad de muestra para su análisis por RFLP. Con el uso de la PCR muestras tan mínimas como pueden ser un pelo con raíz, una minúscula mancha de sangre o semen e incluso caspa son suficientes en muchos casos para llevar a cabo el análisis de identificación genética.

La molécula del ADN esta presente en cada célula nucleada, por lo tanto es factible encontrarlo en materiales biológicos dejados en el lugar de los hechos. El ADN se ha aislado exitosamente y analizado de una gran variedad de materiales biológicos. La aplicación de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha ampliado el intervalo de muestras susceptibles a ser analizadas debido a que se obtienen una gran cantidad de copias de los marcadores que serán examinados. Los materiales más comúnmente analizados en laboratorios forenses son: sangre y semen.⁷

La evidencia de ADN puede ser recolectada de casi cualquier cosa que ha estado en contacto con dichos fluidos. EL ADN ha ayudado a resolver muchos casos cuando los investigadores han recuperado muestras de fuentes no tradicionales se han documentado casos en los que se establece una clara relación biológica entre las muestras recolectados del lugar de los hechos y las personas involucradas directamente con un delito.

Numerosos casos se han resuelto por el análisis de ADN de saliva en colillas de cigarros, estampillas postales, y el área alrededor de la apertura bucal de las máscaras para esquiar. Actualmente se cuenta con estudios que sugieren la alta probabilidad de recuperar ADN a partir de impresiones dactilares.⁸

Los diferentes tipos de muestras biológicas pueden ser utilizados para excluir a un individuo en la participación de un crimen. En particular, la transferencia directa de ADN de un individuo a otro, o a un objeto, puede ser usada para relacionar a un sospechoso con el lugar de los hechos. Como lo señalo el Dr. Henry Lee, esta transferencia directa puede involucrar.

- El ADN del sospechoso depositado sobre el cuerpo de la víctima o su ropa.
- El ADN del sospechoso depositado en un objeto.
- El ADN del sospechoso depositado en un lugar.
- El ADN de la víctima depositado sobre el cuerpo del sospechoso o su ropa.
- El ADN de la víctima depositado en un objeto.
- El ADN de la víctima depositado en un lugar.
- El ADN del testigo depositado sobre una víctima o el sospechoso.
- El ADN del testigo depositado sobre un objeto o lugar.

El valor informativo de las secuencias de ADN que se emplean en la genética forense se basa en el grado de polimorfismo y en la frecuencia de los alelos en la población. Las ventajas del uso del ADN en la medicina legal, son entre otras características que bastan solo mínimos indicios ya que se utiliza la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar la muestra. La calidad de la misma no se ve afectada cuando se trata de tejidos en putrefacción o muestras milenarias ya que pueden emplearse los STRs (Repeticiones cortas en tándem)

Cuadro 1. Objetos más comunes utilizados como evidencias.

EVIDENCIA	POSIBLE LOCALIZACIÓN DEL ADN	FUENTE DE ADN
Bat de béisbol o similar	Donde se colocan las manos o en el extremo del bat.	Sudor, piel, sangre, tejido y pelo.
Sombrero, pañuelo	Dentro	Sudor, pelo, caspa
Anteojos	Lentes y espacios que tienen contacto con la nariz y las orejas.	Sudor y piel
Toallas faciales, hisopos con algodón (cotonetes)	Superficie	Moco, sangre, sudor y cerilla
Ropa sucia	Superficie	Sangre, sudor, semen y saliva
Palillos	Punta	Sangre, sudor y saliva
Cigarros usados	Colilla de cigarro	Saliva
Estampillas o sobres	Área de engomado	Saliva
Tapa o ligadura	Superficie interna y externa	Piel y sudor
Lata o envases de vidrio	Lados y áreas que tiene contacto con la boca	Saliva y sudor
Condón usado	Superficie interna y externa	Semen, células del epitelio uretral, células vaginales o rectales
Cobija, almohada o sábana	Superficie	Sudor, pelo, semen, orina y saliva
Bala	Superficie externa	Sangre y tejido
Mordida	Piel de la víctima o ropa	Saliva

Las técnicas de ADN se han transformado en técnicas altamente sensibles que incluso aquellas muestras tan pequeñas que no puedan ser observadas a simple vista, pueden ser utilizadas para relacionar al probable responsable con el lugar de los hechos. Para ello la evidencia debe ser recolectada, preservada, almacenada y transportada cuidadosamente al laboratorio de ADN.¹⁰

OBJETIVOS

General

Establecer los lineamientos para la recolección, embalaje y envío de muestras e indicios de naturaleza biológica, que garanticen su integridad y calidad necesaria para el análisis forense del ADN.

Particulares

1. Investigar para cada indicio biológico el método de recolección idóneo.
2. Investigar las condiciones de almacenamiento de los principales indicios biológicos.
3. Investigar la ruta crítica del indicio desde su recolección hasta su resguardo por el perito analista.

CAPITULO 1. GENERALIDADES DE LA CRIMINALISTICA

1.1 Criminalística.

Disciplina que aplica fundamentalmente los conocimientos, métodos y técnicas de investigación de las ciencias naturales en el examen de la evidencia física, con el fin de auxiliar a los encargados de administrar justicia. El término fue usado por primera vez por Hanns Gross.¹¹

De acuerdo al Doctor Rafael Moreno González, la Criminalística es: “La disciplina que aplica fundamentalmente los conocimientos, métodos y técnicas de investigación de las ciencias naturales en el examen del material sensible significativo relacionado con un presunto hecho delictivo, con el fin de determinar, con auxilio de los órganos encargados de administrar justicia, su existencia, o bien reconstruirlo, o señalar y precisar la intervención de uno o varios sujetos en el mismo”.

1.2 Clasificación

La Criminalística se divide según el lugar donde se realice la investigación, a saber:

- a) Criminalística de campo: se entiende la investigación que se lleva a cabo en el propio lugar de los hechos. El escenario del crimen, como también se le denomina, es una fuente invaluable de información.
- b) Criminalística de Laboratorio: Es la que se realiza en los laboratorios donde se encuentran los instrumentos usados para el examen del indicio, en ocasiones con fines de identificación o cuantificación. Es la que ha permitido pasar de la época de las aproximaciones a la etapa de las precisiones.

La Criminalística tiene dos objetivos a saber, uno formal y otro material: Formal: es el auxiliar con resultados a los organismos encargados de administrar justicia; el material, es el estudio de los indicios encontrados en la comisión de algún hecho considerado delictivo.¹²

1.3 El método de la criminalística.

La Inducción y la Deducción constituyen, de acuerdo con el Dr. Rafael Moreno González, los procedimientos que con mayor frecuencia aplica la criminalística. La hipótesis formulada producto de los hechos observados, o sea, la solución provisional del problema planteado, así como la comprobación empírica de sus consecuencias, ya sea mediante la observación y la experimentación constituyen las etapas principales de la Inducción. En suma, el razonamiento criminalístico inductivo está basado en la trilogía observación-hipótesis-verificación que aplicado ordenadamente garantiza la validez de sus resultados. El procedimiento Deductivo lo aplica la Criminalística para resolver problemas particulares, con base en los principios generales establecidos mediante la inducción. A éste método se le denomina Hipotético-deductivo, que consiste en formular hipótesis, o sea, soluciones probables del problema planteado y, acto seguido comprobar si están de acuerdo con los datos disponibles. La validez de una hipótesis depende de que consiga comprobar la validez de las consecuencias que de ellas se deduzcan.¹³

1.4 Cadena de custodia.

Es un mecanismo que permite registrar de manera cierta y detallada cada paso que se da, con las evidencias encontradas en el sitio del suceso, para mantener el control del flujograma que ésta desarrolla o experimenta a través de los diferentes sistemas (policial, laboratorio) hasta llegar a las instancias judiciales. Este procedimiento, conforme a su finalidad permite conocer cualquier etapa de la tramitación del proceso, donde se encuentra el elemento de prueba, quien lo tiene, nombre del perito a cargo, etc. lo cual garantiza la transparencia del dictamen emitido por los expertos de los diferentes laboratorios de criminalística, ajustado a la rigurosidad y calidad exigida en la investigación científica.

Esta cadena se manifiesta mediante un formulario de registro de información que debe ser iniciado por el personal especializado que se hace presente en la escena del crimen para realizar las diligencias periciales propias de una investigación criminal.

1.5 Lugar de los hechos.

Genéricamente se le ha dado éste nombre al lugar en donde se realiza una investigación encaminada al esclarecimiento de algún probable hecho delictuoso, por lo tanto sería más conveniente llamarle “Lugar de la Investigación”, hasta en tanto no se determine si en el ocurrieron efectivamente los hechos que se investigan. Así entonces el lugar será aquel espacio físico en donde se presume ha ocurrido un delito y que por lo tanto presentará indicios que estén relacionados con el hecho que se investiga, de acuerdo con uno de los principios fundamentales de la Criminalística.¹⁴

1.6 Indicios

La palabra proviene del latín Indicium “que significa signo aparente y de que existe alguna cosa, que a su vez es sinónimo de seña, muestra, vestigio, marca, rastro, pista o indicación, siendo todo aquel material sensible significativo (cadáver, armas, huellas, objetos etc) encontrado en el lugar de los hechos o del hallazgo, el cual es percibido mediante la vista, oído, tacto y olfato que está íntimamente relacionado con un presunto hecho delictuoso.

1.6.1 Clasificación de los indicios

Los indicios que se presentan en un hecho presuntamente delictivo nos acercan al conocimiento de la verdad y estos podrán ser clasificados de acuerdo a diversos criterios.

- Por valor **investigativo** en identificadores y reconstructivos

Identificadores: Son los que por su naturaleza sirven para identificar a la víctima, victimario, lugar de los hechos, tipo de arma, etc. Lo anterior con la aplicación de diversos exámenes y estudios, siempre y cuando haya muestra testigo y muestras problema.

Reconstructivos: son los que por su naturaleza, forma, características, estructura, localización, dimensiones y ubicación, sirven para efectuar una reconstrucción de un hecho, para sí poder establecer como se desarrollaron los hechos y llegar a la verdad del mismo.¹⁵

- De acuerdo al tipo de análisis requerido:

Determinados: Estos requieren solamente de un análisis minucioso a simple vista o con lente de aumento (lupa) y que guardan relación directa con el objeto

o persona que lo produce, tomando en cuenta que por su naturaleza física los podemos clasificar. Por ejemplo: Armas, huellas dactilares etc.

Indeterminados: Estos requieren de un análisis completo para el conocimiento de su composición y estructura de acuerdo a su naturaleza física. Por ejemplo: pelos, fibras, semen, orina, vomito, sangre etc.

- De acuerdo a su relación con el lugar de los hechos:

Asociativos: Son los indicios que se corroboran y que guardan relación directa con el hecho que se investiga.

No asociativos: Los encontramos en el lugar de los hechos o del hallazgo, pero no están relacionados íntimamente con el hecho que se investiga.

- De acuerdo a su tamaño:

Microscópicos. Son aquellos que por su naturaleza, se requiere de algún instrumento (lupa), microscopio, etc. para su observación, por ejemplo: pelo.

Macroscópicos. Este tipo son los que pueden ser observados a simple vista, por ejemplo: mancha de sangre, boquete, armas, etc.

- De acuerdo a su naturaleza física:

Trasladables. Son aquellos que por su naturaleza, como sería su forma, volumen, peso, o cualidades inherentes, etc. Se pueden sacar del lugar de los hechos y se pueden preservar de forma adecuada para trasladarse al laboratorio para su respectivo estudio. Por ejemplo: armas, pelos, fibras, etc.

No trasladables. Son aquellos que por su naturaleza, como sería su forma, volumen, peso o cualidades inherentes, etc. No pueden moverse para trasladarlo al laboratorio para su respectivo estudio, ya que alteraría el lugar de los hechos. Por ejemplo: impresiones latentes de huellas dactilares, huellas de: herramientas, pies, zapato, neumáticos, etc. éstas se obtienen y se preservan mediante las siguientes técnicas: fotografía, levantamiento de impresiones latentes, moldes de yeso, etc.

Orgánicos. Todos los de procedencia humana o animal, (alimentos, ceras, grasa etc).

Inorgánicos. Pueden ser naturales (polvo, óxido, cenizas, manchas, etc.) y artificiales (tintas, armas, restos de incendios, papeles, monedas etc).¹⁶

1.7 Técnicas

A) Observación

La observación consiste en el examen completo, metódico y meticuroso del lugar, con el fin de encontrar todos los indicios y evidencias posibles para determinar su relación con el hecho.

B) Fotografía forense

Esta técnica viene a ser un complemento de suma importancia, ya que da la imagen objetiva de los indicios que estén relacionados al hecho, siendo de gran apoyo para la descripción escrita, ya que con ellas se fija con precisión los detalles y particularidades del lugar y las características de los indicios, el lugar debe estar fijado con exactitud y nitidez.

C) Fijación

Es el aseguramiento de todos los indicios que se hallaron en el lugar de los hechos y del lugar mismo; se hace con el objetivo de contar con un registro que pueda ser utilizado en cualquier momento e incluso estar integrado en la averiguación previa.

Existen diferentes tipos de fijación, pero los más frecuentemente utilizados son la fijación fotográfica, la escrita o narrativa, la planimétrica y por moldeo.

D) Embalaje

En relación con la protección técnica de las evidencias o indicios, los peritos de las diversas especialidades deberán conocer las técnicas de embalaje para cada uno de los indicios, a efecto de conservar sus características originales y no alterarlos al momento del levantamiento o de su traslado al laboratorio.¹⁷

CAPITULO 2. CONSIDERACIONES GENERALES

2.1 Estructura del ADN

EL ADN es uno de los dos ácidos nucleicos que se encuentran en las células de los organismos vivos. Se encuentra en el núcleo celular formando parte de los cromosomas y en el citoplasma dentro de los mitocondrias, en el caso de las células vegetales, también está en los cloroplastos.

El ADN es un polinucleótido constituido por dos cadenas antiparalelas de unidades de desoxirribonucleicos unidos covalentemente, dispuestos de una forma complementaria y adoptando una estructura enrollada de doble hélice dextrógira. Esta formado por un azúcar (pentosa), bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y ácido fosfórico. El ADN contiene la pentosa desoxirribosa; como bases púricas tiene Adenina - Guanina y como bases pirimídicas a la Citosina y Timidina.

Los nucleótidos son las unidades monoméricas de la macromolécula de ácido nucleico, que resultan de la unión covalente de un fosfato y una base heterocíclica con la pentosa. Dentro del nucleótido, la combinación de una base con la pentosa constituye un nucleósido.

El ácido nucleico formado por diferentes nucleótidos alternados dentro de las cuatro variantes mencionadas y en forma lineal, en una doble cadena helicoidal, codifica para la producción de proteínas o polipéptidos.¹⁸

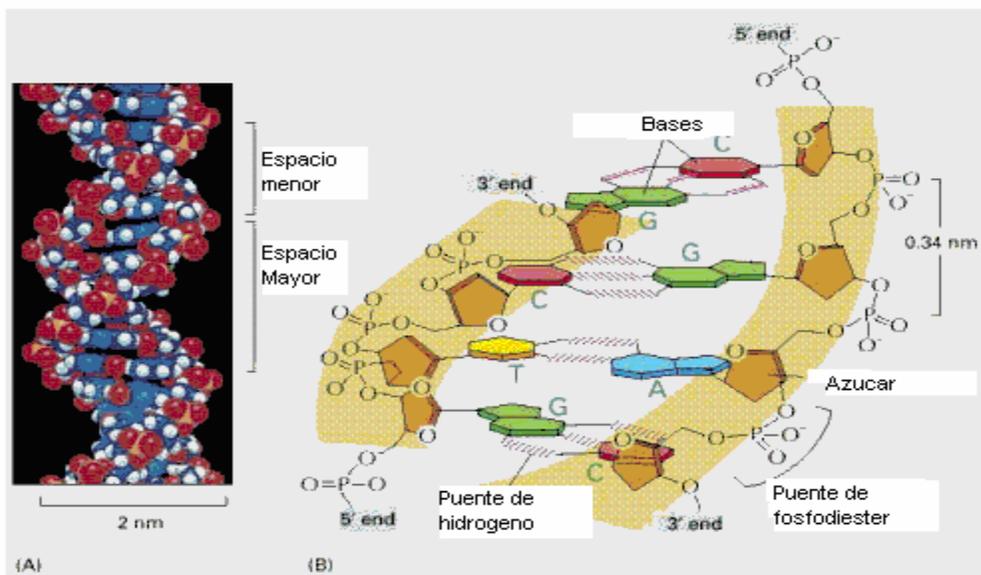


Fig. 2. Observamos que el ADN está constituido por una doble hélice, con dos bandas de entre las cuales, existen a modo de peldaños, un par de moléculas específicas.

2.2 Clasificación del ADN

El ADN se divide en dos grandes grupos en base a su función:

a) ADN codificante o esencial. Es el encargado de almacenar información genética en los genes, que son los diferentes sectores de ADN con un orden concreto en la disposición de los nucleótidos que determina la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican y el grado de expresión del gen en cada tejido y en cada tiempo.

b) ADN no codificante. No guarda información genética y juega un importante papel en la función de los cromosomas y, sobre todo actuando como puntos calientes de recombinación. Este ADN puede ser de dos tipos: ADN espaciador, el cual está formado por una secuencia sencilla de bases que se dispone entre regiones codificantes del genoma y ADN repetitivo, que lo forma una secuencia que, al contrario del espaciador se dispone por todo el genoma debido a la existencia de múltiples copias. A su vez este ADN repetitivo se divide según las características de la secuencia en: "Secuencias repetidas en tándem" en las que existe una repetición de la misma secuencia una y otra vez y todas seguidas, en un fragmento de ADN.

---ATCGG ATCGG ATCGG ATCGG ATCGG -----

Y "secuencias repetidas intercaladas", tratándose de una secuencia larga de bases que aparece repetida, pero no a continuación del primer grupo de secuencia repetitivo, sino en un lugar diferente y distante del genoma:

-----ATCCCCGGGGAATCGATAAACGGATC-----
ATCCCCGGGGAATCGATAAACGGATC-----

Las características generales del ADN no codificante lo hacen especialmente útil para su aplicación a la identificación en Medicina Forense. El ADN esencial está formado por secuencias altamente conservadas con muy pocas variaciones interindividuales e intergeneracionales, ya que de lo contrario se podrían ver afectadas funciones básicas para la vida de las personas. Los mínimos cambios que tienen lugar, cuando son viables, aumentan el polimorfismo de proteínas y enzimas, aunque también pueden tener efectos negativos.

El ADN no codificante presenta una gran variabilidad de unos individuos a otros, ya que estas secuencias no son conservadoras al no afectar sus cambios a la fisiología del individuo. Las variaciones debidas a cambios de bases sencillos, procesos de inserción-delección o de intercambio de ADN (recombinación) durante la formación de las células germinales (meiosis) hacen que se modifique el número de repeticiones o el orden de las bases de un determinado fragmento repetitivo, pudiendo producirse en un locus sencillo o múltiples loci, siendo este el origen de la variación que hace que no haya dos personas, a excepción de los gemelos univitelinos, que tengan la misma secuencia del ADN.¹⁹

2.3 Función del ADN

El ADN es una biomolécula que se encuentra en el interior de la célula y contiene toda la información necesaria para construir un individuo completo. Prácticamente todos los seres vivos tienen como portador de la información genética el ADN a excepción de los retrovirus como el virus de Inmunodeficiencia humana (HIV). El ADN es un componente imprescindible de cada célula en el ser humano y además el ADN de un individuo es el mismo en todas sus células. (sangre, semen, saliva, células de la piel, etc)

2.4 Utilización de Restos orgánicos utilizados para identificar el ácido desoxirribonucleico de una persona.

Se ha realizado un buen número de pruebas científicas que prueban que el ADN es la base de la herencia, entre las que se puede destacar:

- a) En proceso normal de reproducción celular, los cromosomas (estructuras con ADN) se duplican para proporcionar a los núcleos hijos los mismos genes que la célula.
- b) Las mutaciones provocadas se producen por una alteración de la estructura del ADN que tienen como efecto una grave alteración de la descendencia de las células afectadas.
- c) El ADN extraído de un virus basta por si mismo para reproducir el virus entero, por lo que, en la esfera jurídica y a efectos legales, tiene toda la información genética para ello.

El ADN puede llegar a ser muy útil en Derecho, no sólo para identificar a una persona gracias a los restos orgánicos encontrados donde se haya cometido un crimen, en especial en delitos contra la libertad sexual o en los que se ha ejercido violencia, sino también para determinar la filiación biológica de una persona.

El análisis de ADN es una herramienta muy poderosa que revolucionó la ciencia forense hasta convertirse en la “nueva forma de la evidencia científica”. Varios factores han contribuido a su rápida evolución: solo se requieren trazas de material biológico, el ADN es más estable en comparación con otros marcadores biológicos tradicionales y es un método muy preciso. La trascendencia social de la tecnología del ADN en la identificación humana, la convierte en el arma más eficaz contra la delincuencia. No existen dos personas con el mismo ADN, a excepción de los gemelos idénticos. Es igual en todas las células del cuerpo humano. Las diferencias en la secuencia del ADN entre los individuos constituye el fundamento científico para identificarlos y establecer la relación de parentesco biológico entre ellos. v

Las cinco áreas de impacto más importantes de esta especialidad son: la criminalística, las pruebas de paternidad, la identificación de personas desaparecidas, la identificación de individuos en desastres y la historia que combina las aplicaciones anteriores. Esta reciente herramienta, que tiene sus bases en la genética clásica, la bioquímica, la estadística y la biología molecular, ocupa un lugar importante en los juicios donde se trata de identificar y/o relacionar evidencias entre acusado, víctima y lugar de los hechos.

CAPITULO. 3 TECNICAS PARA EL ESTUDIO DEL ADN

Existen numerosas técnicas y procedimientos que emplean los científicos para estudiar el ADN. Una de estas herramientas utiliza un grupo de enzimas especializadas denominadas enzimas de restricción, que fueron encontradas en bacterias y que se usan como tijeras moleculares para cortar los enlaces fosfato de la molécula de ADN en secuencias específicas. Las cadenas de ADN que han sido cortadas con estas enzimas presentan extremos del mismo tipo. Los científicos utilizan este tipo de enzimas para llevar a cabo la tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética. Esto implica la eliminación de genes específicos de un organismo y su sustitución por genes de otro organismo.

a) FLPs (fragmentos de restricción de longitud polimórfica)

En 1985 se describió por primera vez el uso de esta técnica para análisis de paternidad. En esta técnica se utilizan enzimas llamadas de restricción (por ejemplo Hae III) para cortar el ADN en sitios previamente conocidos por su gran variabilidad (regiones hipervariables) en la búsqueda de una secuencia específica. Los fragmentos resultantes se colocan en una matriz hecha de un gel. Una corriente eléctrica se aplica al gel y los fragmentos (que tienen carga negativa) migran a lo largo del gel (dirigiéndose al polo positivo) de manera tal que los fragmentos más grandes son más lentos. Los fragmentos así separados son transferidos a una membrana de nylon, la cual es expuesta posteriormente a una sonda de ADN marcada, ésta es un pequeño segmento sintético de ADN que reconoce específicamente y por lo tanto se une a un segmento único (locus) del ADN de la persona que se está examinando.

Esta metodología de análisis aún es utilizada por algunos laboratorios para resolver casos de paternidad.

Las desventajas más importantes para ser aplicadas en la resolución de casos criminales son la enorme cantidad de ADN que requiere y la alta calidad del mismo, condiciones que sólo en casos excepcionales se presentan en el ámbito criminal.

b) VNTR (Número variable de repeticiones en tándem)

Copias de fragmentos de secuencias idénticas de unos 30 – 50 pares de bases que se suceden ininterrumpidamente en un cromosoma. La existencia de los VNTR origina los diferentes alelos y por lo tanto el polimorfismo. Ésta técnica sustituyó a los RFLPs en medicina forense.

c) STR (Repeticiones cortas en tándem)

Son locus cuyos VNTR están compuestas solo por una secuencia de 2 a 7 pares de bases que se repiten en tándem de modo que pueden ser analizados por PCR. Se pueden amplificar en conjunto de 3 a 15 marcadores en una sola reacción de PCR, en consecuencia tienen una gran estabilidad, son altamente polimórficos, ideales para muestras degradadas, ahorran tiempo, material y lo más importante la muestra, por lo que son muy útiles en criminalística.

d) Souther blot

Esta técnica consta básicamente de las siguientes etapas:

1. Digestión del ADN con enzimas de restricción tras extraer ADN de alta molecularidad.
2. Separación de los fragmentos obtenidos por medio de electroforesis en gel de agarosa.
3. Desnaturalización de los fragmentos separados y cortados.
4. Transferencia de las cadenas simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon y fijación de las mismas por medio de calor (80°C).
5. Prehibridación con sondas de ADN inespecíficos que pudiera haber en la membrana.
6. Marcaje de la sonda con nucleótidos radioactivos.
7. Hibridación de la sonda marcada y desnaturalizada con los fragmentos de ADN fijados a la membrana, y lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda.
8. Revelado en placa radiográfica e interpretación de los resultados.

Esta técnica fue sustituida por la PCR, debido a que presentaba limitaciones como por ejemplo: Requería gran cantidad y calidad de ADN, así como también el factor tiempo, era muy prolongado.

e) PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Como su nombre lo indica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de A, T, C y G) y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se desea copiar para que sirva como cebadora (primers).²⁰

Permite amplificar más de 1 millón de veces el ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos.

Procedimiento

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15 – 20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (primers) actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual esta habitualmente catalizada por una enzima llamada “Taq polimerasa” dicha enzima se aísla de una bacteria termófila denominada *Thermus acuáticus* que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85°C). A ésta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G – C. La temperatura óptima a la que actúa la Taq polimerasa permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases:

- **Desnaturalización:** Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95 °C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.
- **Hibridación:** Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los primers y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa. **Extensión:** Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una

- extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.

Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el tiempo de rampa. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del aparato donde se realiza automáticamente este proceso, el termociclador. En las nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo.

Figura 2



Figura 3. Sintetizador automático de ADN. Las bases nucleotídicas son adicionadas una por una a un soporte sólido localizado en una columna desechable delimitada por dos filtros. Las bases están separadas en distintas botellas. Los reactivos localizados en las botellas grandes son auxiliares para completar cada acoplamiento.

COMPONENTES DE LA PCR

Buffer de Amplificación

Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y $MgCl_2$. El $MgCl_2$ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa.

La concentración óptima de $MgCl_2$ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.²¹

Primers

A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

- La longitud de cada uno de los primers debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud (30-35

- bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad.
- Ambos primers deben tener una T_m similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C).
- La relación bases púricas: bases pirimidínicas debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).
- La secuencia de los primers debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.
- Para evitar la formación de dímeros de primers es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí.

Los dímeros de primers consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los primers y se producen cuando un primer es extendido a continuación del otro. El mecanismo exacto por el que se forman estos dímeros no está completamente determinado. La observación de que primers con los extremos 3' complementarios favorecen su formación sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios. Algunas polimerasas, incluida la Taq, han mostrado una débil actividad polimerizadora no dirigida por un ADN patrón, la cual puede unir nucleótidos adicionales al doble extremo apareado. Si esta actividad puede producirse sobre una hebra sencilla de oligonucleótidos, resultaría una buena oportunidad para que la extensión formara un corto solapamiento en el extremo 3' con el otro primer, suficiente para promover la formación del dímero.

Desoxinucleotidos Trifosfatos (dNTPs)

Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a $200\ \mu\text{M}$ para cada uno de ellos. En un volumen de reacción de $25\ \mu\text{l}$ con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre $6-6.5\ \mu\text{g}$ de ADN. La concentración de dNTPs y de MgCl_2 va relacionadas ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la Taq polimerasa suficiente Mg como para incorporar dNTPs. Para una concentración de $200\ \mu\text{M}$ de cada dNTP se suele añadir MgCl_2 a una concentración de $1.5\ \text{mM}$.

Taq--Polimerasa

Las cantidades óptimas de Taq polimerasa necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en $25\ \mu\text{l}$ de volumen final de reacción. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg_2^+ y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad.

Por otro lado, pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50-60% con un máximo aparente cuando su concentración es de $50\ \text{mM}$. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la Taq. Por ejemplo concentraciones $1\ \text{M}$ de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas

concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

ADN Molde "TEMPLATE"

Es el ADN del cual se desea copiar un determinado fragmento, es, por tanto, el ADN que la Taq polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

- Del marcador que se va a amplificar: hay marcadores cuyos primers son más específicos o bien cuyas condiciones de amplificación están mejor optimizadas que las de otros. Por esta razón puede darse el caso de que cierta cantidad de ADN (sobre todo cuando jugamos con cantidades mínimas) amplifique para unos marcadores pero no para otros. Por ello, cuando en un laboratorio se va a utilizar un nuevo marcador es necesario hacer un estudio de validación en él que se incluye un estudio de sensibilidad. De dicho estudio de sensibilidad puede sacarse como conclusión cuál es la mínima cantidad de ADN que amplifica en condiciones estándar. De manera general, para casi todos los STR utilizados en Genética Forense la cantidad óptima de ADN que asegura un rendimiento adecuado está en torno a los 5 ng.
- Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR. El problema de las cantidades mínimas de ADN y la presencia de contaminantes o inhibidores de la Taq es un hecho habitual en Criminalística y requiere un estudio pormenorizado de la muestra antes de la amplificación.

Adyuvantes de la PCR

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. El adyuvante más utilizado es el BSA (albúmina sérica bovina), a concentraciones por encima de 0.8 μ g/ μ l éste incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.

La PCR ofrece una serie de ventajas, frente al uso de las técnicas de análisis genético utilizadas con anterioridad, como son:

- Su capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es mínima o en casos en los que el ADN esté parcialmente degradado.
- Genera en un espacio corto de tiempo un elevado número de copias de la secuencia de ADN que es objeto de estudio, lo cual permite utilizar técnicas de visualización más sencillas y rápidas que el uso de sondas marcadas radiactivamente.
- Permite la determinación y agrupación alélica en clases discretas, lo que facilita la elaboración de bases de datos al ser la estandarización inmediata y posibilitar la aplicación de métodos bioestadísticos y programas elaborados.
- El uso de marcadores microsátélites de pequeño peso molecular aumenta las probabilidades de obtener resultados positivos de amplificación cuando el ADN se encuentra degradado ya que puede ser que dichos fragmentos no hayan sido digeridos. Esta ventaja es de gran importancia en Criminalística ya que normalmente los indicios biológicos encontrados han estado sometidos a diversos factores (calor y humedad) que favorecen el crecimiento bacteriano.
- Una de las más grandes ventajas es su elevada sensibilidad puede, en ocasiones, convertirse en un gran problema ya que se podría coamplificar un ADN extraño.²¹

Esta técnica también presenta desventajas, como son que no es una técnica cuantitativa y presenta alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación.

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son separados en función de su tamaño por medio de un proceso de electroforesis. Actualmente se utilizan dos tipos de electroforesis:

- Electroforesis en geles verticales de poliacrilamida
- Electroforesis capilar

La llegada de las muestras al laboratorio para su procesamiento es el eslabón que viene a unir los dos fragmentos de la cadena de la investigación criminal. Por una parte, todo el estudio preliminar llevado a cabo en el lugar de los hechos, y por otra el análisis científico en el laboratorio forense.

Todas las acciones del personal relacionado con la investigación van destinadas a un mismo fin: la averiguación del autor o autores del hecho, en este caso por medio de la identificación del donante o donantes de unos determinados indicios biológicos. Sin embargo, se tiende a pensar que sólo los últimos pasos, aquellos que van a proporcionar el resultado del análisis genético son lo únicos verdaderamente importantes, esto hace que en muchas ocasiones se pierda un poco de concentración y atención necesaria en las primeras fases de la investigación, y que se piense que con lo avanzado de la técnica hoy por hoy se es capaz de estudiar cualquier indicio, cualesquiera que sean sus condiciones y que lo que se puede hacer mal en las fases preliminares luego será solventado por el buen hacer del personal del laboratorio y por los adelantos científicos.²²

Las enormes posibilidades de la tecnología del ADN no deben ser motivo para confiarnos a la hora de realizar la investigación en el lugar de los hechos y pensar que la solución a la investigación dependerá del laboratorio en cuestión al que se remitan los indicios hallados, ya que no sólo se trata de buscar una determinada evidencia, sino de hacerlo correctamente, de lo contrario podría ser que pierda su actividad biológica o que la prueba quede invalidada por un defecto en la investigación preliminar. Por elemental que parezca, no debemos olvidar nunca que en los laboratorios sólo se estudia aquello que se remite, y que el análisis se inicia sobre el indicio en las condiciones en las que llega, no en las que se manda, de ahí la enorme importancia del indicio en el lugar de los hechos.

El indicio es el soporte sensible del ADN. La naturaleza tan variada de los indicios exige en rigor la concurrencia de especialistas muy diversos en algunas de las fases: policías, médicos, químicos, físicos, expertos en balística, y huellas, en fotografía, todo esto incluye conocimientos de las ciencias naturales.

Cualquier indicio puede resultar clave en un caso determinado, pero sin lugar a dudas en los hechos criminales violentos, son los indicios biológicos los más trascendentes, por su significado y por la información que de ellos se puede obtener a través del análisis del ADN.

Por lo tanto se deduce que los indicios pueden ser muy diversos y que, por lo tanto, pueden ser muy distintos los profesionales que se vean envueltos en la investigación de unos hechos criminales enfocándose en aquellos que por su frecuencia, importancia y naturaleza hacen que el químico forense adquiera una posición privilegiada, haciendo de su actuación una pieza fundamental del

rompecabezas que todo caso judicial supone. La investigación pericial consta de tres grandes etapas:

- 1) Búsqueda en la escena del crimen o sobre las víctimas y/o los implicados
- 2) Recolección y envío al laboratorio
- 3) Exámenes analíticos y su interpretación.

En las dos primeras, el papel del químico forense es fundamental en relación a los vestigios orgánicos, debido a que está familiarizado con ellos y conoce sus peculiaridades, y de ahí que deba saber también la forma de levantarlos y enviarlos adecuadamente.²³

capítulo 5 AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LOS RIESGOS DE CONTAMINACIÓN del ADN

Los indicios han de ser buscado y recogidos en el lugar de los hechos, por lo que se debe exigir una perfecta detección, identificación y aislamiento de los mismos para evitar la contaminación de índole biológico o químico que pudiere producirse. Por lo tanto, se deduce que existen dos tipos fundamentales ó básicos de contaminación que, pueden afectar a las muestras e indicios biológicos criminales:

- la contaminación química y
- la contaminación biológica.

Se denomina contaminación química a la presencia de productos de origen bioquímico o químico (tintes, colorantes, pinturas, esmaltes, carburantes, aceites, etc.) que van a dificultar los procesos de análisis en el laboratorio, bien sea durante la extracción, cuantificación, restricción ó amplificación del ADN.

Este tipo de contaminación es muchas veces inevitable, ya que suele encontrarse en el sustrato de donde cae la mancha y puede ser penosa para el laboratorio pues impide que las investigaciones lleguen a buen puerto. Cada proceso de análisis de los mencionados tiene variaciones técnicas que se pueden aplicar cuando se sospecha de una contaminación química, gran número de casos se alcanza una solución satisfactoria aunque alarga enormemente el proceso de análisis.

Existe también la contaminación biológica que es propia de indicios humanos, al consistir en la mezcla de ADN que no pertenece al indicio con ADN de la evidencia misma. Las técnicas empleadas en la actualidad tienen gran efectividad para obtener información de indicios biológicos mínimos, invisibles muchos de ellos para el ojo humano. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la secuenciación del ADN mitocondrial por técnicas de secuenciación en ciclos son capaces de amplificar una sola célula que contenga ADN de una persona aunque esté mezclada con miles de células con ADN de otra persona. Esta circunstancia, denominada genéricamente “sensibilidad” es un grave peligro en la investigación criminal, ya que una mezcla indeseada de muestras puede originar graves problemas. Por ello, es necesario tomar desde el comienzo de la investigación, las máximas precauciones posibles.

La contaminación biológica de los indicios criminales puede ser de tres tipos: anterior o previa, coetánea o paralela y posterior, que a su vez puede ser accidental, negligente o criminal, según la relación que guarden con el hecho criminal que motiva la investigación. Todas ellas son peligrosas, en tanto cuanto pueden tergiversar o inutilizar los resultados, aunque la más peligrosa de todas es la posterior, ya que no ofrece ningún dato útil a la investigación y es totalmente evitable.

La contaminación se descubre normalmente en el laboratorio, cuando al analizar los indicios se detecta ADN de más de una persona. En este momento el investigador debe plantearse cuál es el origen de la contaminación, para poder adoptar los protocolos analíticos oportunos y poder valorar correctamente los resultados. Por ello, el personal de los laboratorios debe tener la garantía de que la contaminación no se ha producido criminal o negligentemente, con posterioridad al delito (por existir dificultades técnicas al analizar las muestras) o servir de base para que alguna de las partes presentes en el proceso (defensa, acusación particular, Ministerio fiscal) puedan pedir, en buena lógica la anulación de la prueba (al no estar los resultados claros) o reclamen la coautoría los de los hechos por parte de otras personas desconocidas y no procesadas²⁴

5.1 Contaminación anterior o previa

Se debe a la presencia de material biológico con ADN en el lugar donde luego van a aparecer los indicios, y se caracteriza por ser inevitable (al estar presente antes de que se depositen los indicios criminales), por ser parcialmente valorable (al poder descubrirse que es accidental, por ejemplo en sustratos muy contaminados) y por ser potencialmente útil (el producto contaminante puede ser del criminal, de algún coautor o de una víctima previa).

Evidentemente, si en un caso determinado aparece una pequeña mancha de sangre (evidencia) en la perilla de una puerta, en un fragmento de baldosa o en un cenicero, en el momento de recogerla es inevitable que el investigador pueda arrastrar ADN de otras personas que, siendo ajenas al hecho criminal, dejaron el mismo depositado al abrir la puerta, al pisar la baldosa o en manejar el cenicero. Existen métodos de recolección de muestras que tratan de evitar la inclusión de ADN contaminante al recoger el indicio criminal. Con este fin, por ejemplo, se puede tomar parte de una mancha de sangre o de semen por medio de un hisopo de algodón estéril y solución salina estéril, en vez de recortar o raspar la mancha completa del sustrato.

Paralelamente, en los laboratorios hay que realizar controles negativos del indicio, consistentes en la amplificación del material obtenido de trozos de sustrato que tiene el indicio. Por ejemplo, si encontramos una mancha de sangre en un zapato de cuero, no sólo hemos de intentar extraer el ADN del trozo de cuero que tiene la sangre, sino que hemos de tomar lino o más trozos de cuero de otras zonas del zapato y tratarlas como si tuvieran ADN, sometiénolos a procesos de extracción. Si en un trozo de cuero que no estaba manchado (control) aparece ADN, hemos de deducir que existe una contaminación, que habrá de valorar adecuadamente de acuerdo a las circunstancias del caso.

Este tipo de contaminación puede ser, en ciertos casos y circunstancias de utilidad, ya que puede ofrecernos pistas sobre diversas circunstancias relacionadas con un sustrato o sustratos que por sus características deberían de estar totalmente limpios, aparecen muy contaminados con ADN de múltiples orígenes o viceversa.

En otras ocasiones, cuando se intenta confirmar que un indicio procede de una persona, aparecen también datos genéticos de otra: por ejemplo, en el caso en que aparezca un pañuelo manchado con sangre cerca del cadáver de una persona que murió por un disparo de arma de fuego, la idea inicial de los investigadores puede ser confirmar que la sangre es del fallecido pero también podemos encontrarnos con restos de ADN del homicida, si el pañuelo era de su pertenencia, pudiendo servir este dato para incriminarlo posteriormente. Evidentemente, cada caso es un mundo diferente pero en los que todas las posibilidades hay que tenerlas en cuenta.

En general, las contaminaciones previas que más utilidad tienen por la información que pueden ofrecer, son propias de los casos en que el arma homicida era una pertenencia personal del autor del crimen (arma blanca o de fuego, correas o cinturones, lazos o pañuelos en casos de asfixia. Etc.).

5.2 Contaminación Coetánea o Paralela

El ADN de un indicio se mezcla con ADN de otro origen en el momento de los hechos, y al igual que la contaminación anterior o previa se caracteriza por ser inevitable, valorable y útil.

Se diferencia, en la práctica de la “contaminación anterior” en que la paralela es valorable y útil, ya que los indicios que se mezclan son de personas envueltas en los hechos criminales mientras que la contaminación anterior, los indicios pueden no tener relación con los hechos violentos, como de hecho así ocurre en la mayoría de esos supuestos.

Es propia de hechos especialmente violentos, en los que tanto la víctima como el agresor depositan material biológico con ADN de un mismo sustrato al mismo tiempo. Hay que remitirse en estos casos al ejemplo más típico: dos personas heridas y perdiendo sangre que se enzarcan en una lucha en muchos lugares aparecerá sangre de los dos mezclada. También se pueden dar mezclas muy variadas de diversos fluidos, como son el semen, la saliva, orina (en casos más excepcionales, pueden servir de origen del ADN los restos de piel del agresor en las uñas de la víctima o viceversa).

También es propio de criminales con stress, el dejar huellas o rastros evidentes, no es propio de criminales con experiencia, ni de crímenes bien planeados o ejecutados, siendo en estos casos factor común el “stress” o tensión nerviosa y/o emocional en que se encuentra el autor por haber sido parcialmente descubierto, por tener que abandonar el lugar de los hechos de prisa, por herirse con posterioridad, etc.

Sin embargo, los casos paradigmáticos de contaminación paralela o concomitante son los supuestos de violación (vaginal, anal y oral) en los que el semen del criminal se mezcla con células y fluidos de las diversas estructuras anatómicas de la víctima. En estos casos, la contaminación es conocida “a priori” por el

investigador, y puede ser manejada adecuadamente tomando controles de la víctima: cuando aparezcan dos ADN diferente, uno será conocido por ser de la víctima, siendo el restante del violador.

La contaminación paralela es especialmente valorable cuando la víctima sobrevive y es capaz de dar una explicación de los hechos, lo que permitirá centrar la investigación en indicios especialmente útiles y posteriormente facilitará los análisis en el laboratorio.

En los casos de violación y en todos aquellos supuestos en los que uno de los indicios sea semen mezclado con cualquier otra muestra biológica, existen técnicas de extracción diferencial que permiten aislar el ADN contenido en los espermatozoides y separarlos de otras células como las del epitelio vaginal o de la mucosa oral.

5.3 Contaminación Posterior

Se debe al depósito de ADN de diversos orígenes en los indicios y sustratos criminales con posterioridad al momento de los hechos. Puede tener origen accidental, negligente o criminal.

Se caracteriza por ser notablemente evitable, parcialmente valorable (sólo en los casos en que se pueda demostrar que la contaminación es posterior, identificando al donante del material biológico) e inútil (al no aportar datos de interés a la investigación).

5.4 Contaminación Posterior Accidental

En el periodo de tiempo transcurrido entre la ejecución de un hecho criminal y el momento en que se encuentran y aíslan los indicios, es obvio que se puedan depositar otros materiales biológicos que contengan un ADN que normalmente no esta relacionado con los hechos.

Básicamente deben distinguirse los indicios que aparecen a la intemperie, (susceptibles de ser afectados por fenómenos meteorológicos y de entrar en contacto con animales, insectos, personas y objetos contaminados) y que son fácilmente contaminables, de aquellos que aparecen aislados (enterrados en habitaciones o espacios cerrados, etc.) en los que la contaminación posterior es más difícil, pero no es imposible.

En general cualquier indicio puede contaminarse “a posteriori” con material que contenga ADN y que sea arrastrado por animales salvajes y domésticos, insectos (especialmente moscas y mosquitos), personas ajenas a la investigación que los tocan desconociendo la importancia que pueden tener, o incluso tratando de ayudar a los investigadores (personas que encuentran y recogen cualquier indicio para llevarlo a la policía) o por fenómenos naturales y meteorológicos.

Con una valoración siempre prudente de los hallazgos, la contaminación posterior nos puede dar datos de la situación en que ha permanecido el indicio, incluso sobre cambios de ubicación (accidentales o intencionados) que haya podido sufrir hasta el momento en que fue encontrado.

5.5 Contaminación Posterior Negligente

Se debe a la culpa por desconocimiento o por falta de celo profesional de aquellas personas que manejan los indicios y tienen la obligación de preservarlos perfectamente.

Para evitarla se debe aislar el lugar de los hechos lo más rápido posible y con los medios que inicialmente haya al alcance, en principio y hasta poder valorar claramente la situación, más vale “aislar por exceso” que por defecto.

El lugar de los hechos suele ser punto de reunión de todas las personas implicadas en las diversas fases de la investigación, convirtiéndose muchas veces en un ambiente sobrecargado donde se habla continuamente, se fuma, se bebe y hasta se come, siendo todas estas fuentes de contaminación evitables. El acceso debe estar inicialmente restringido a todos los investigadores y autoridades hasta que no hayan evaluado y tomado las muestras biológicas que puedan contener ADN.

5.6 Contaminación Posterior Criminal

Se produce cuando alguna persona tiene acceso a los indicios, bien en el lugar de los hechos bien durante su transporte o en los lugares donde se almacenan, para proceder a cambiarlos, tergiversarlos o destruirlos.

Por esto ha de destacarse en este lugar la importancia que tiene la custodia de los indicios de este tipo y la necesidad de mantener la “cadena de custodia”, dejando constancia de qué personas han tenido acceso a los indicios y quiénes han sido los responsables de su transporte y almacenamiento desde el momento de la recolección hasta que termina su análisis en el laboratorio.

CAPITULO 6 CONSIDERACIONES PRELIMINARES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS E INDICIOS DE NATURALEZA BIOLÓGICA

En la investigación de un hecho, es importante la fase preanalítica de los indicios recibidos en el laboratorio. Aunque desde el punto de vista técnico y científico el estudio de las muestras sea impecable, el esfuerzo hecho será en vano si la recolección, embalaje y envío al laboratorio de los indicios fue erróneo y se cometieron diversos errores como: utilizar una sola bolsa para diferentes muestras. No etiquetar correctamente los contenedores de los indicios. No enviar rápidamente las muestras al laboratorio. Etc.

Por ello es importante enfatizar los criterios esenciales para una buena recolección de indicios.

En este sentido deben seguirse las siguientes normas generales:

En un caso de violación

Tipo de muestra a recolectar:

Semen: En exudado vaginal, anal, oral, preservativos y papel higiénico, saliva en piel (zonas erógenas) latas de refresco, papel higiénico. Pelo en superficie corporal y ropas, tejido en lecho ungueal, sangre del probable responsable y de la víctima o denunciante.

En un caso de homicidio

Tipo de muestra a recolectar:

Sangre: en el lugar de los hechos, semen en cavidades corporales, preservativos y papel higiénico. Saliva en zonas erógenas, latas de refresco, papel higiénico. Pelos y fibras en superficies corporal y ropas, tejido en lecho ungueal, sangre de probable responsable y del denunciante o víctima.

En caso de maternidad o paternidad

Tipo de muestra a recolectar: Sangre de las personas involucradas en el estudio, tejido blando o duro

En caso de desastres masivos

Tipo de muestras a recolectar: Tejido blando y duro, sangre de parientes

En caso de personas desaparecidas

Tipo de muestras a recolectar: Fluidos en prendas, sangre de parientes, tejido óseo, dientes.

En el estudio de hechos históricos

Tipo de muestra a recolectar: tejido óseo y sangre de parientes

Material requerido:

Hisopos estériles, solución salina estéril en frasco gotero de plástico, guantes, cubrebocas, bata, peine desechable, pinzas, encendedor o lámpara de alcohol, cajas de cartón, pluma y plumón, sobres de papel, cortaúñas, palillos, alcohol, bolsa de papel, tubos vacutainer, agujas estériles para sistema vacutainer, ligaduras, torundas, papel FTA (flinders technology associates), y pipetas de transferencias estériles,

Capítulo 7 GENERALIDADES DE LOS INDICIOS

- **Sangre**

La sangre es uno de los indicios que se encuentran con mayor frecuencia en la mayoría de delitos violentos, por lo que su estudio es invaluable.

A continuación, se hará un relato detallado de la manera correcta de tomar muestras de sangre en el lugar de los hechos, después de que han sido adecuadamente fijadas mediante la descripción escrita, la planimetría y la fotografía.

La sangre derramada o lanzada, vertida o proyectada, babeada o arrojada, es el indicio más valioso, el rastro más importante que puede encontrarse en el lugar de los hechos. No solamente tiene una importancia decisiva para demostrar la perpetración del crimen, sino que también aporta un sólido fundamento para la acusación, constituyendo muchas veces la única prueba plena y fehaciente, la prueba técnica que conduce inequívocamente a la condenatoria del probable responsable.²⁶

Las muestras de sangre nunca deben ser expuestas a calor o a humedad excesiva. Si es posible, la evidencia de sangre debe ser refrigerada hasta que pueda ser transportada al laboratorio, o bien, ésta puede ser recolectada en un papel filtro especial llamado FTA (Flinders Technology Associates). La evidencia debe ser llevada al laboratorio .

A la variedad morfológica de este indicio sangriento (manchas, trazas, huellas, etc), genéricamente se le denomina, en su conjunto, imagen hematoscópica.

La imagen hematoscópica puede clasificarse de la siguiente manera: manchas circulares y manchas alargadas. Ahora bien por sus dimensiones pueden ser pequeñas, medianas, grandes y muy grandes. Según sus contornos, serán regulares e irregulares. Si nos referimos a la cantidad, se clasifican en mancha lenticular, charco, laguna. Cuando sale de la herida en forma de chorro, deja una imagen característica: la chorreadura. Cuando es arrojada con violencia en pequeña cantidad, produce un roceado o salpicadura.

Resulta evidente que la situación y forma de las manchas están en relación con la índole de las heridas, las situaciones de víctima y agresor, los movimientos y una serie de circunstancias que se deducen en el escenario del crimen.

- **Semen**

El semen, casi siempre un testigo mudo de las agresiones sexuales, es decir, de los delitos que atentan contra la libertad sexual. El esperma se puede encontrar como mancha o fluido sobre las ropas, sobre el propio sospechoso o sobre la víctima, aportando así una prueba muy significativa.

Composición del semen: Esta constituido por fructuosa, Prostaglandinas (E2, A, B) Aminoácidos, fósforo, Potasio, Hormonas.

El líquido espermático está constituido por espermatozoides, células propias del epitelio uretral y plasma seminal. Son células haploides que constituye el gameto masculino de los animales. Su función es la formación de un cigoto al fusionarse su núcleo con el gameto femenino, fenómeno que dará lugar al embrión y al feto. En la fecundación humana los espermatozoides dan el sexo a la nueva célula diploide, pues pueden llevar cromosoma sexual X o Y mientras que el óvulo lleva solo el cromosoma X.

Los espermatozoides constan de tres partes: cabeza, que contiene el núcleo (ADN), porción intermedia y cola. Su color y aspecto es lechoso, algo opalescente. La opalescencia es proporcional a la concentración de espermatozoides. Coagula inmediatamente después de la eyaculación.²⁷

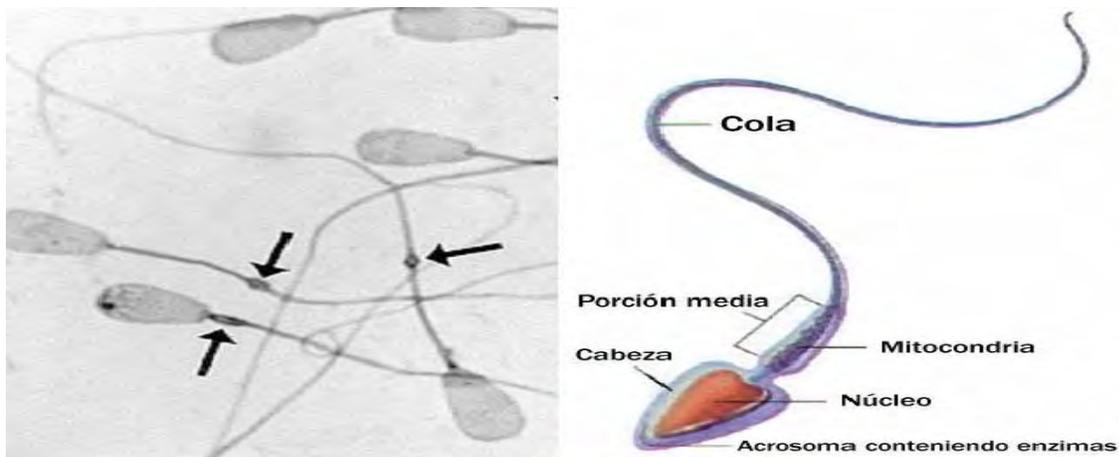


Fig. 4. Morfología de un espermatozoide humano

En los tejidos absorbentes forma unas manchas de color gris-amarillo, bien delineadas y de consistencia almidonada. Si la mancha es reciente, tiene un olor típico. En las telas blancas las manchas se perciben mal y deben examinarse por transparencia. Cuando son de color han de examinarse a trasluz y por contacto para determinar la consistencia almidonada. Cuando las telas son impermeables aparecen como pinceladas de barniz. Sobre los pelos, constituyen un magma grisáceo que los aglutina y sobre objetos sólidos aparecen costras brillantes.

- **PELO**

El pelo cubre casi toda la superficie cutánea, presentando variaciones de color, cantidad y longitud, según la región anatómica, el sexo y la raza. Su forma es generalmente cilíndrica. El 91% del cabello está compuesto por una proteína fibrosa llamada queratina y su forma es similar a la de un tallo cilíndrico con una raíz llamada folículo piloso. Es ahí donde nace, se forma y crece.

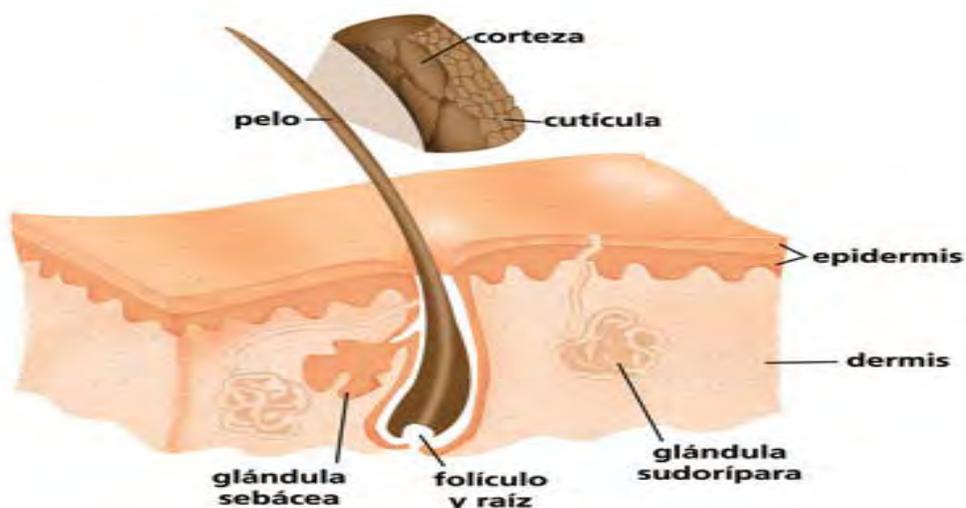


Fig. 5 .Estructuras del pelo humano

En los humanos, generalmente se habla de cuatro tipos de pelo, caracterizados principalmente por su textura y su longitud.²⁷

El lanugo es fino, suave y poco pigmentado y carece de médula central. Existen dos capas de lanugo, una que cubre al feto y se cae justo antes de nacer, y otra que crece después del nacimiento y se cae durante el tercer o cuarto mes de vida.

El vello alcanza generalmente una longitud de menos de un centímetro. Crece en los niños pequeños tras la caída del lanugo y se trata de un cabello fino, poco pigmentado y medulado. El vello sigue creciendo durante toda la vida y generalmente entre el 6 y el 25 % del cabello del cuero cabelludo es de este tipo.

El intermedio tiene aproximadamente un centímetro de longitud y se forma en el cuero cabelludo de los niños entre los 3 y 7 meses de edad. Puede durar hasta 2 años.

El terminal crece mucho más de un centímetro y es más denso y más grueso que los otros tipos de cabello. Crece en el cuero cabelludo, las cejas y las pestañas antes de la pubertad. El cabello sexual secundario como el pelo púbico o el pelo de la barba en los varones, también es cabello terminal.

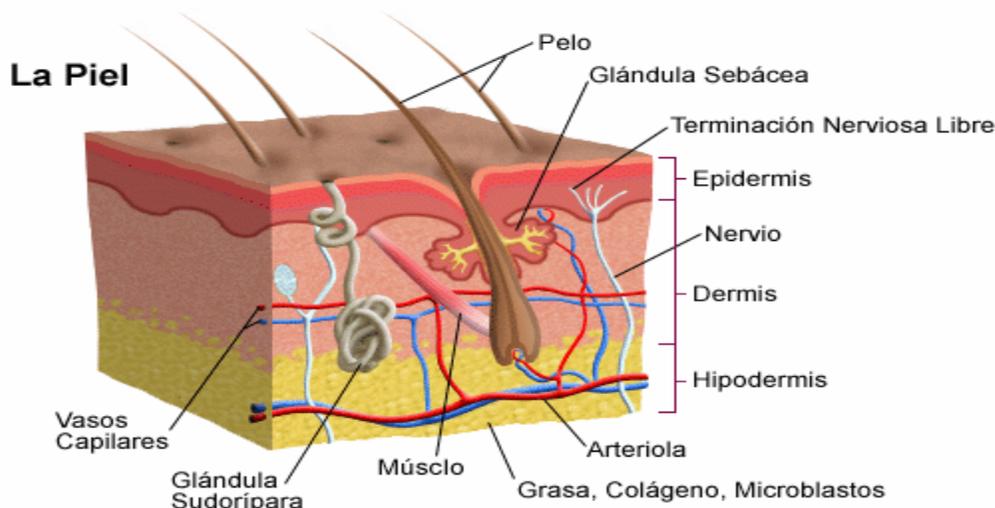
El bulbo reviste un gran interés medico-legal y criminalístico ya que hace posible diferencial los pelos caídos espontáneamente o de bulbo lleno, de los arrancados carentes de bulbo. Así mismo contiene la información genética (ADN) que permite una individualización segura y directa. La base de la raíz está dilatada en el bulbo que se apoya sobre la papila dérmica y la rodea. Todos los folículos o raíces se forman antes del nacimiento y no hay manera natural de generarlos una vez que salimos del vientre de la madre.

- **Piel**

La piel protege la red de músculos, huesos, nervios, vasos sanguíneos y todo lo que hay dentro de nuestro cuerpo. Nuestra párpados tienen la piel más fina y las plantas de los pies, la más gruesa.

Las uñas protegen los extremos sensibles de los dedos de las manos y de los pies. Las uñas humanas no son necesarias para la vida, pero proporcionan apoyo para las puntas de los dedos de pies y manos, los protegen contra lesiones y ayudan a tomar objetos pequeños. Sin ellas, nos sería muy difícil rascarnos la comezón o desatar un nudo. Las uñas pueden ser indicadores de la salud general de una persona y las enfermedad.

Fig. 6. Partes que componen la piel



- **Saliva**

La saliva es un líquido de la cavidad bucal, producido por las glándulas salivales, transparentes, de viscosidad variable, compuesto principalmente por agua, sales minerales y algunas proteínas.

Se estima que la boca está humedecida por la producción de entre 1 y 1.5 litros de saliva al día, Esta cantidad de saliva es variable ya que va disminuyendo conforme avanzan los años y debido a diferentes tratamientos, su composición varía en función de los estímulos (como el olor ó la visión de la comida).

Las funciones de la saliva son:

- Mantener el pH a 6.5
- Da protección al esmalte: Funcionando como defensa, lubricante y regulando el pH
- Como reparadora: favoreciendo la mineralización.
- Digestiva: Al mezclarse con el alimento se transforma en bolo alimenticio.
- Importante en la expresión oral
- Mantiene el equilibrio hídrico
- Capacidad tamponadora del medio: Neutraliza el medio ácido producido tras las comidas. Si se produce un pH ácido se provoca la desmineralización del esmalte, mientras que se produce un pH básico, se acumula sarro.

CAPITULO 8 RECOLECCION Y PRESERVACION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Debido a que muestras biológicas extremadamente pequeñas pueden ser usadas como evidencias, se debe poner especial atención en la contaminación cuando se identifiquen, colecten y preserven las muestras para estudios de ADN. Las muestras pueden estar contaminadas cuando el ADN de otras fuentes se mezcla con el ADN relevante relacionado con el caso. Esto puede suceder cuando alguien estornuda o tose sobre la evidencia o toca su boca, nariz y otras partes de la cara y después toca la zona que puede contener el ADN involucrado con el ilícito. Debido a que la tecnología denominada PCR replica o copia el contenido de ADN en la muestra biológica, la introducción de contaminantes de otras fuentes puede resultar muy problemática. Para evitar este inconveniente, se deben tomar precauciones especiales como son el usar cubrebocas, guantes, un contenedor para cada tipo de muestras, etc. a fin de prevenir los contaminantes que en cualquier circunstancia son indeseables. Si se recolecta una muestra biológica para estudios de ADN, el proceso de PCR copiará cualquier ADN presente en la muestra, haciendo imposible distinguir entre el ADN del probable responsable y el ADN de otra fuente.

Una vez que el lugar de los hechos ha sido totalmente identificado, y se ha localizado la evidencia, se podrá empezar el proceso de colección. La colección usualmente inicia con la evidencia más frágil o más fácil de perder. Se debe tener una consideración especial con los objetos o evidencias que requieren ser movidos por ejemplo: una puerta, un automóvil, una mesa, etc.²⁸

Las evidencias biológicas son transferidas por vía directa por: un preservativo usado, un coagulo de sangre; indirecta, estas quedan sobre superficies por absorción o adherencia por ejemplo arena, un kleenex, una colilla de cigarro, etc. En general, las muestras líquidas son absorbidas dentro de las superficies y las evidencias sólidas se adhieren a las superficies. El método de recolección depende ampliamente del estado líquido o sólido y de las condiciones de la evidencia.

A continuación se mencionan los lineamientos específicos para la recolección de muestras biológicas para el análisis de ADN.

8.1 Normas Generales de Recolección

- Fijar la escena del crimen mediante; fotografía, dibujo etc.
- Recoger, si es posible, en primer lugar los indicios biológicos.
- No añadir conservantes a las muestras.
- Evitar hablar o estornudar sobre las muestras. Usar mascarillas si es posible.

Condiciones de máxima esterilidad, usando guantes de goma, si se entra en la escena del crimen, bata y zapatones así como instrumentos

- esterilizados o perfectamente limpios para la obtención de materiales (pinzas, tijeras etc.).
- Volver a limpiar o utilizar un nuevo instrumento para recoger un indicio diferente. Si se recoge con guantes, cambiar los mismos si se recoge un elemento diferente. Usar diferentes para cada indicio, aunque hayan sido recogidos en lugares muy próximos o estuviesen juntos.
- Empaquetar en bolsas de papel o cartón, evitar las bolsas de plástico, y de celofán que condensan la humedad y favorecen la proliferación de bacterias que degradan el ADN.
- Etiquetar perfectamente cada uno de los recipientes con lo siguiente:
 - a. Fecha y hora
 - b. Identificación de la víctima.
 - c. Localización del indicio.
 - d. Tipo de indicio.
 - e. Número del mismo.
 - f. Nombre de la persona que lo recoge.
 - g. Referencia al caso judicial.
- Enviar lo más rápidamente posible al juzgado o laboratorio, asegurando que las muestras que se encuentren con cadena de frío, se mantenga.
- Es fundamental y básico tomar muestras testigo de la víctima y sospechoso. De ser posible extrayéndole sangre, o en su defecto con frotis de la cavidad bucal.
- Tomar la filiación de todas las personas que han intervenido o colaborado en la recogida de las evidencias, por si se presentan problemas de contaminación cruzada.
- Para la toma de referencia en personas vivas, debe existir un documento firmado con la autorización expresa para realizar el análisis.²⁹

8.2 Sangre

Algunas de las principales recomendaciones son las siguientes:

- **Muestra de sangre líquida en un individuo**

La sangre debe ser colectada por personal capacitado.

Recolectar sangre en un tubo vacutainer de aproximadamente 5 ml. Con EDTA como anticoagulante.

Las muestras de sangre deben ser refrigeradas no congeladas.

Etiquetarlas y

Enviarlas al laboratorio tan pronto como sea posible.²⁰

- **Muestras de sangre líquida en el lugar de los hechos**

La sangre líquida presente en el lugar de los hechos debe ser colectada con una pipeta desechable (preferiblemente estéril) y transferida a un tubo de ensayo con EDTA.

Un papel filtro de FTA puede ser usado para absorber sangre líquida o sangre coagulada (evitando áreas que contengan suero únicamente).

Las muestras se deben preservar con un anticoagulante como EDTA y mantenerse en refrigeración. Finalmente estas muestras se deben etiquetar y llevar al laboratorio tan pronto como sea posible.

Sangre coagulada

Cuando la sangre se encuentra en forma de coágulos, se tomarán éstos con el extremo de un aplicador de madera y se colocarán en un tubo de ensayo limpio y seco, agregando 1 mL de solución salina estéril por cada 5 mL de sangre. Etiquetarlas y enviarlas al laboratorio.

- **Muestra de sangre líquida en nieve o agua**

Las muestras de sangre en nieve o agua se deben colectar inmediatamente para evitar una dilución excesiva, ya que la temperatura afecta directamente en la dilución de la sangre.

Se deben recolectar aproximadamente 5 mL de esta muestra dentro de un contenedor limpio o en papel FTA evitando cualquier tipo de contaminación.

Etiquetar y enviar las muestras al laboratorio tan pronto como sea posible.

- **Manchas de sangre húmeda en ropa**

La ropa con manchas de sangre húmeda se deben colocar sobre una superficie limpia y permitir que se sequen al aire libre

Nunca colectar ropa húmeda o ropa con manchas de sangre húmedas en un contenedor sellado herméticamente o bolsas de plástico, esto causaría que las muestras retuvieran humedad y provocaría el crecimiento de bacterias y el deterioro de la misma.

Una vez que la ropa y la mancha se han secado, se debe recortar un área donde exista la mancha de sangre empaquetarlo en un contenedor de cartón o de papel apropiadamente etiquetado, con otro fragmento de la

ropa, preparado de la misma forma, se tomará una muestra control de una zona del soporte no manchada con sangre.
Etiquetar y enviar las muestras al laboratorio tan pronto como sea posible.

- **Manchas de sangre húmeda en objetos**

Los objetos pequeños con manchas de sangre húmeda se deben secar al aire libre para posteriormente colectarlos.

Se debe hacer un esfuerzo para preservar la integridad de cualquier mancha de sangre durante el empaquetado y la transportación.

Los objetos grandes no pueden ser removidos del lugar de los hechos porque podrían tener manchas de sangre húmeda en ellos. La sangre húmeda debe ser absorbida con una tela absorbente antes de ser empaquetadas.

Cada objeto y contenedor debe ser etiquetado y enviado.

- **Manchas de sangre húmeda en objetos móviles**

Las manchas de sangre seca en armas, vestimentas y otros objetos móviles se deben colectar individualmente por colección del objeto completo.

Cada artículo se debe colocar en un contenedor (papel) individualmente y este debe ser sellado, etiquetado y enviado.

- **Manchas de sangre seca sobre sólidos o superficies no absorbentes de objetos fijos**

Las manchas de sangre se deben documentar de manera detallada. La mancha puede ser levantada con una cinta adhesiva o raspada con una espátula estéril y colocada dentro de una pieza de papel limpio, o bien con un hisopo estéril previamente humedecido con solución salina estéril que se encuentra en frasco gotero de plástico, rotando la superficie del mismo para recolección de la evidencia. La cinta o el papel con sangre adherida puede ser colocado dentro de un sobre sellado; el hisopo se colocará en una caja porta hisopos para su transporte. Cada objeto debe ser sellado, etiquetado y enviado.

Manchas de sangre seca sobre objetos grandes o fijos donde las manchas no pueden ser raspadas y los objetos no se pueden cortar.

En aquellos casos en que la mancha no puede rasparse o el objeto en donde esta no se puede cortar se recomienda:

Hacer un bosquejo de la mancha de sangre y documentarla

La mancha e sangre puede ser tomada con un hisopo previamente humedecido con solución salina esterilizada rotando el hisopo en el área de la mancha.

El hisopo se deja secar al aire. Se empaqueta.

El paquete se coloca en un sobre sellado o en una caja porta hisopos etiquetados y enviados.

Siempre debe tenerse un control repitiendo el procedimiento en un área adyacente de la superficie.

- **Manchas de sangre seca sobre objetos que pueden ser cortados**

Cuando la mancha se localiza sobre objetos factibles de cortar se recomienda lo siguiente:

Hacer un bosquejo de la mancha de sangre y documentarla.

Una porción del objeto que contenga la mancha de sangre se puede extraer cortando con una herramienta limpia.

Cada corte se debe empaquetar individualmente y etiquetarlo.

Una porción del objeto sin mancha debe ser colectado como un control, empaquetado y enviado.

Salpicaduras de sangre

Las salpicaduras a menudo son difíciles de coleccionar de las superficies. Se debe utilizar cinta adhesiva limpia de huellas digitales para levantar las salpicaduras de sangre en superficies que no pueden levantarse por ejemplo una ventana, una pared, etc.

Cada pieza de la cinta utilizada se debe empaquetar y etiquetar individualmente dentro de un contenedor plástico por ejemplo una bolsa, de manera que resguarde la muestra, colocar la cinta con la muestra de sangre en la mitad de la bolsa.

Tomar un control negativo con la cinta. Sellar, etiquetar y enviar el contenedor.

8.3 Semen

- **Manchas seminales y semen encontrados en el lugar de los hechos**

Documentar los indicios del crimen por notas, fotografías o videocasete del semen.

Usar un hisopo estéril desechable y levantar la mancha humedeciendo el hisopo con solución salina estéril con movimientos rotatorios.

Etiquetar

Mantener la muestra refrigerada y enviarla al laboratorio tan pronto como sea posible.

Alternativamente, el líquido seminal puede ser absorbido con una tela de algodón que posteriormente se seca al aire libre, empaquetar, sellar y etiquetar.

Tomar un control negativo, de la misma tela se corta una parte que no contenga muestra.

- **Manchas seminales sobre objetos móviles**

Las manchas seminales en pantaletas, ropa, sábanas, almohada y otros objetos que se puedan mover se deben coleccionar como tales, (se llevara la evidencia totalmente al laboratorio)

Si un artículo tiene una mancha húmeda, la mancha se debe secar al aire libre, y después coleccionar el objeto.

Cada objeto debe ser empaquetado individualmente en un contenedor de papel limpio. Por ejemplo bolsas de papel limpias y secas.

Cada objeto debe ser etiquetado y sellado.

Los objetos empaquetados se deben refrigerar si es posible y enviarlos al laboratorio tan pronto como sea posible.

- **Manchas de semen en objetos grandes que se pueden cortar**

Ejemplos de objetos grandes que pueden ser cortados y que pueden tener manchas seminales en ellos, son: las alfombras, sábanas y la tapicería.

Documentar los indicios del crimen por notas, fotografías o videocasete del semen.

Usar unas tijeras limpias para cortar el área que contenga la mancha.

Cortar otra área que no contenga la mancha, como control negativo.

Poner cada corte separadamente dentro de piezas de papel limpio.

Hacer un envoltorio seguro para la evidencia, para evitar cualquier contaminación.

Colocar el envoltorio dentro de un contenedor de papel, sellar el contenedor y etiquetarlo.

Manchas seminales sobre superficies no absorbentes y fijas

Ejemplos de estas superficies son: pisos, mostradores y superficies metálicas.

Documentar los indicios del crimen mediante notas, fotografías o videocasete del semen.

Usar una espátula limpia para raspar manchas de semen, depositarlo en sobre de papel limpio perfectamente rotulado.

Raspar una pequeña área en la que no se observe mancha de semen, como control negativo.

Esterilizar la espátula después de cada uso, para evitar la contaminación.

Colocar los hisopos en una caja porta hisopos.

Etiquetar y enviar

- **Muestras de semen en la víctima**

Las víctimas de ataque sexual siempre deben ser examinadas médicamente por personal calificado y autorizado (doctores, químicos forenses) en busca de líquido seminal.

El equipo estándar que se debe usar para la recolección de evidencias en una violación (guantes, hisopos, tijeras, contenedores, papel absorbente etc.) debe permitir recolectar muestras vaginales, orales y anales según se requiera, así como de zona púbica e inguinal si la víctima refiere rastro de semen en estas zonas. Este tipo de muestras biológicas son recolectadas con hisopos estériles, desechables y no humedecidos si en muestras de mucosas o ligeramente humedecidos, con solución isotónica estéril si se recolectan muestras de la piel.²¹

Cada indicio se debe recolectar, sellar y etiquetar.

El indicio se debe enviar al laboratorio tan pronto como sea posible.

8.4 Tejidos, Órganos, Dientes y Huesos

En varias ocasiones, en el laboratorio de genética se reciben evidencias biológicas en estado sólido. Este tipo de material es frecuentemente recuperado en casos de desastres masivos, secuestros, atropellamientos y personas desaparecidas. La dificultad y el tiempo invertido en el análisis de estas muestras está relacionado con el grado de dureza y compactación del tejido de manera que resulta más laborioso y tardado el estudio de huesos y dientes que en tejido muscular.

- **Tejidos, órganos, dientes y huesos recientes (material biológico que aún no han sufrido deterioro)**

Cada indicio debe ser descrito mediante notas y fijado por fotografía o videocasete.

Este tipo de indicios se pueden levantar con pinzas limpias y flameadas (colocadas al fuego aproximadamente 5min.)

Cada objeto se debe colocar dentro de un contenedor (bolsa de plástico) limpio sin ninguna sustancia fijadora.

Cada contenedor debe ser sellado, etiquetado, y almacenado dentro de un refrigerador.

Los indicios se deben enviar al laboratorio tan pronto como sea posible.

- **Tejido, órganos, dientes y huesos envejecidos (material biológico deteriorado por el tiempo)**

Cada indicio de ser fotografiado y registrado antes de la recolección. El tamaño, forma y la relación espacial de la muestra con el resto del lugar de los hechos debe ser documentado.

Cada objeto se debe levantar con guantes de látex limpios. Las muestras relacionadas se deben embalar juntas.

Colectar 2.5-5 cm³ de músculo esquelético rojo

Colectar de 7.5 – 12.5 cm de hueso largo, tal como fémur

Tener cuidado de no contaminar ningún objeto con material de otro.

Cambiar guantes para la colección de cada tejido.

Los dientes se colectan con unas pinzas limpias con cuidado de no apretar con fuerza, en el siguiente orden: molar, premolar, caninos y dientes frontales. Se van colectando uno a uno.

Cada tejido se debe colocar en un contenedor limpio, que puede ser una bolsa de papel limpia y seca ésta se debe sellar y etiquetar.

La evidencia se debe almacenar en un lugar fresco a temperatura ambiente y enviarla al laboratorio tan pronto como se posible.²⁹

8.5 Saliva

Las manchas de saliva se pueden encontrar en cigarrillos empezados y puro, en las pipas, pañuelos, en vasos, en las tasas o sobre el cuerpo de una víctima. También en las estampillas postales, en los sobres o en los chicles. Sobre las telas presentan un color amarillento, blanco o gris. Sus contornos son imprecisos e irregulares y almidonan ligeramente el paño. Su búsqueda se debe realizar con luz ultravioleta, debido a que poseen cierta, aunque débil fluorescencia de mucina.³⁰

8.5 Manchas de Fluidos

Las manchas de orina, saliva u otras manchas de fluidos corporales se colectan con una pipeta estéril si se encuentran en estado líquido, o se extraen del sustrato cortando el área o utilizando hisopos estériles, previamente humedecidos con solución salina estéril, o bien con papel FTA especial para el levantamiento de saliva.

La orina humana o animal se puede encontrar en el sitio del suceso en forma líquida o en forma de manchas, dependiendo de la naturaleza del soporte. Se puede hallar sola o asociada con meconio, excremento, semen, sangre, etc. Al examen microscópico se presenta en forma de manchas de color amarillento y de un olor característico.

Colocar cada muestra en un contenedor de papel limpio. La muestra se debe colectar y colocar dentro de un envoltorio de papel limpio o en una caja porta hisopo. El envoltorio posteriormente se debe colocar dentro de otro contenedor de papel que bien puede ser una bolsa, el cual deberá sellarse y etiquetarse adecuadamente.

Las muestras se transportarán al laboratorio tan pronto como sea posible.

8.7 Pelo

Si se realizan exámenes de ADN en pelo se necesita también muestra de sangre conocida. (ver anexo1)

Estos deben ser levantados con pinzas y con extremo cuidado y depositados en sobres perfectamente sellados para su estudio en el laboratorio. Habrán de remitirse por separado, en distintos recipientes, los pelos recogidos en sitios diferentes y, a su vez, los sobres irán rotulados con las indicaciones sobre el lugar del hallazgo. Por supuesto antes de llevar a cabo estas operaciones, se deben fijar fotográficamente, así como hacer su precisa descripción escrita, complementada con un croquis. De ser necesario, un solo pelo con bulbo es suficiente, pero se recomienda recolectar no menos de tres mediante arrancado, y fijarlos mediante una cinta adhesiva a una placa de cartulina o plástico. Se sugiere no usar portaobjetos de vidrio, ya que pueden romperse durante el traslado. Siempre deben colectarse muestras de control, aproximadamente 30 pelos de varias regiones anatómicas y embalarse por separado. Su cotejo morfológico, realizado por el área de patología forense, siempre deberá realizarse con pelo de idéntica procedencia regional.³¹

Un aspecto importante en las pruebas de identificación de muestras forenses es entender la manera en la cual la exposición al ambiente puede afectar los resultados de la prueba. Desde que las propiedades físicas o químicas del ADN están bien entendidas es posible predecir que una exposición prolongada a los rayos del sol, una temperatura cálida y una alta humedad provocará la degradación del ADN. Incluso aún sin la presencia de factores externos, las endonucleasas liberadas sobre la célula muerta pueden causar la degradación del ADN. Sin embargo, debido a que estos rompimientos ocurren en sitios cercanos y al azar, la probabilidad de generar fragmentos de ADN de un tamaño particular por una endonucleasa de restricción, dependerá de que tan grande fuera la degradación de ADN y del tamaño de los fragmentos de ADN a ser detectados. Los fragmentos polimórficos largos de ADN son más probables de convertirse en un blanco de rompimiento al azar. Una observación común hecha en muestras de ADN degradado es que los alelos más largos desaparecen mientras que los más pequeños permanecen. Más aún cuando se examinan los polimorfismos de ADN es importante analizar cada locus individualmente.

En los estudios en los que se han utilizado manchas de sangre y semen muestran que el ADN que se puede utilizar para el análisis de RFLP han sido recuperados después de muchos años.

La destrucción o degradación de las muestras es resultado de la acción de enzimas que azarosamente degradan el ADN empezando por el final de la molécula (exonucleasas) o produciendo un rompimiento doble de las hebras (endonucleasas). Estas enzimas están presentes en la célula o en bacterias y empiezan su acción después de que la célula muere. La sangre dentro de tubos estériles con EDTA o citrato, como preservativos, puede ser almacenada por varios días a temperatura ambiente y por muchos años a 4°C. Sin embargo, una vez abiertas las muestras de sangre en citrato se contaminan rápidamente y la estabilidad del ADN disminuye. La sangre recolectada en tubos heparinizados se coagulará en pocos días y el rendimiento del ADN se verá enormemente reducido, además se conoce que la heparina es inhibidor de la polimerasa. Tal vez, el procedimiento más rápido y sencillo para preservar muestras es congelándolas. Este procedimiento se aplica a muchas muestras de material biológico debido a que éste detiene el crecimiento de bacterias y la actividad de las enzimas que dividen o rompen al ADN. La mejor temperatura para almacenar material biológico por un periodo ilimitado es a -70 °C o en nitrógeno líquido. Por un periodo de pocas semanas éste puede ser almacenado a -20 °C. Se recomienda almacenarlo en hielo, solamente, por pocas horas y no más de pocos días. Una vez que una muestra ha sido congelada esta no se debe descongelar y congelar repetidas veces, ya que esto favorece el rompimiento celular y facilita la degradación del ADN.³²

Otra manera de preservar muestras es secar al aire las muestras líquidas sobre papel filtro o sobre tela de algodón limpia, Artículos, tales, como sangre o semen

se pueden almacenar por muchos años como manchas secas en sobres sellados (para protegerlos de la humedad) y almacenarlos a 4 ° –20°C.

No se recomienda preservar los tejidos en formaldehído u otros químicos similares, ya que el ADN se degrada después de un almacenamiento prolongado.

Una muestra de tejido que haya sido fijada se debe enjuagar con solución salina y después mantenerla refrigerada o congelada hasta que esté lista para procesarla.

Una ventaja del ADN sobre las proteínas es que el ADN es más resistente a la degradación que las proteínas a causa de las condiciones ambientales. Los efectos más significativos del ambiente sobre el ADN son los rompimientos hidrolíticos y oxidativos.

CONCLUSIONES

Es muy importante que la gente especializada en coleccionar los indicios, lo realice bajo condiciones mínimas de manipuleo, es decir lo menos posible, a fin de evitar su contaminación, llevando con esto a su destrucción. Frecuentemente los casos se pierden porque la persona encargada de hacer la evaluación de la escena considera que ciertas pruebas o evidencias no son importantes y por lo tanto decide no recogerlas ni preservarlas, y en el peor de los casos manipularlas sin la más mínima precaución, alterando el material biológico presente en dichas muestras y por consecuencia invalidando por completo los resultados de la prueba del ADN.

Toda cadena de custodia debe realizarse bajo condiciones confidenciales, de identificación y de continuidad de quien, cuando y donde la realiza, desde la simple fijación, la descripción, la recolección de las muestras biológicas, su embalaje, y finalmente su envío al laboratorio de Genética, donde se pretende llegue en su estado original, ya que estos puntos por sencillos que parezcan a simple vista, pueden hacer fracasar la prueba del ADN, es también muy importante la interpretación de los resultados, de nada sirven todos los estudios realizados en el laboratorio si no se les sabe interpretar. La calidad de la muestra es importante en este tipo de análisis, debido a que ésta limita el estudio, simples detalles como la superficie en que se encuentra, el estar mezclada con tierra u otras sustancias biológicas que pueden interferir de una manera fundamental en el desarrollo de la prueba.

Deben mantenerse custodiados en un refrigerador hasta recibir las instrucciones oportunas por parte de las Autoridades correspondientes. Cuando se proceda al envío de las muestras, hay que asegurarse de que las muestras continúen en un medio frío, hasta su envío al laboratorio, ya que son etapas fundamentales en una cadena de custodia que le da validez a todo estudio realizado.

Este trabajo monográfico se propone como material de consulta tanto en instituciones educativas como de procuración de justicia.

ANEXO 1

Criminalística identificadora en el estudio de los pelos.

Los estudios más importantes que el cabello como indicio biológico ofrece a la Criminalística son los siguientes:

1. El estudio morfológico del pelo bajo el microscopio permite resolver en forma sencilla si el pelo es de un ser humano, la observación de las escamas o cutícula del pelo, su índice medular y el tipo de médula que presenta son elementos que en-forma-objetiva-lo-determinan.

La relación matemática entre el diámetro del canal medular y el total del pelo, tomado en su parte más ancha, se conoce con el nombre de índice medular, el cual, en caso de ser menos de 0,5, se entiende que es humano o de algunas especies animales como el guanaco, la llama u algunos antropoides, los que son fácilmente descartables por el estudio morfológico.

Otro método para determinar su origen humano es la determinación de su índice escamoso.

El pelo esta formado por tres capas: la cutícula, formada por escamas transparentes externas, situadas como el recubrimiento de un tronco de palmera; corteza o córtex, integrada por células inertes, las que le dan forma, color, elasticidad y resistencia; y, una parte interna compuesta por la médula.³³

El índice escamoso se refiere a la cantidad de escamas que tiene la parte externa del pelo, la cutícula, por unidad de longitud, lo que permite identificar una peculiaridad susceptible de ser utilizada en el cotejo entre diversos pelos.

2. Para determinar la región, de la cual viene el pelo se considera el largo, el diámetro, la forma de la punta, el material que cubre la superficie y la forma de la sección-transversal.

3. La forma en que se observa la raíz del pelo en estudio, los bordes del extremo cortado y otras características físicas son necesarias para evaluar si el cabello fue arrancado, cayó involuntariamente o fue cortado

4. Si ha sido cortado, ¿fue con un instrumento bien afilado u obtuso? En este caso la observación detallada de la muestra es importante, ya que aplastamientos del pelo, bordes deshilachados o cortes al sesgo, dan la información para sacar conclusiones al respecto

5. Diferentes técnicas permiten conocer si ha sido decolorado previamente o no, la detección de sustancias de tinción por técnicas analíticas instrumentales también aportan información para hallar fácilmente la respuesta a esta pregunta.

6. El calor pueden deberse a la acción de los más variados agentes: llamas, electricidad, metales calientes, encrespadores, explosiones, etc.

Si el calor es tan intenso (+/- 300°) que produzca la combustión del pelo, la parte quemada se carboniza y queda adherida a la no quemada. Sometido a menos temperatura, el pelo cambia de color al gris, café, rojo y negro, según los grados de calor, se hace transparente y quebradizo, apareciendo en su interior burbujas gaseosas en forma de rosario.

En caso de ser quemado por agua caliente o vapor, sufre también deformaciones de las cuales las más características son debidas a las quemaduras por vapor.

Si el vapor está a más de 250° C, el pelo se enrolla en espiral, se hace quebradizo, y de rojizo pasa a rojo negruzco, se hace más transparente y aparece el clásico collar de burbujas en su interior.

Si éste está alrededor de los 180° C, el pelo se pone rojizo y agrietado longitudinalmente.

Estos datos son útiles para determinar a qué temperatura el cuerpo de la víctima ha sido expuesto.

7. Los métodos de determinación de sexo en pelo, están basados en la tinción diferencial de los cromosomas sexuales.

Estos se hallan en la interface de los núcleos de las células de la vaina de raíz del pelo. Una nueva técnica basada en la tinción del cromosoma "Y", desarrollada por el Laboratorio de Scotland Yard y diseñada para la determinación de sexo en manchas secas de sangre fue adaptada para la vaina de raíz de pelo

Esta técnica utiliza la solución colorante fluorescente de clorhidrato de quinacrina, y si el pelo en estudio da un índice mayor de 30% de células con cromosoma "Y" es considerado del sexo masculino.

Los núcleos de las células presentarán un color verde fluorescente brillante sobre un fondo verde pálido. El cromosoma "Y" se observará como una mancha amarillo verdosa brillante localizada generalmente en la periferia de los núcleos y ocasionalmente en el centro de los mismos.³⁴

Se obtienen resultados confiables hasta las seis semanas después de haberse caído o arrancado.

8. Efectos de disparos de arma de fuego en el pelo. Es tanto mayor la multiplicidad de deformaciones que sufre el pelo que ha sido tocado por un disparo, mientras más cerca de él se encuentre la boca del arma en el momento de disparar.

Cuando es a boca de jarro, hay verdaderas quemaduras, con encrespamiento y chamuscado típico del pelo, burbujas gaseosas, impregnación de pólvora, y, a veces, hasta partículas metálicas.

Si el pelo es muy espeso y abundante, su estudio es tanto más importante, cuanto que va a enmascarar algo el aspecto común de las heridas sobre la superficie recubierta por él.

A medida que la boca del arma se aleja de la superficie del pelo, estas deformaciones van siendo menores, hasta ofrecer muy escasas características.

9. La posible existencia de venenos metálicos en el sujeto del cual procede. Algunos tóxicos metálicos se acumulan en el cabello y por técnicas microquímicas adecuadas, se puede comprobar la presencia de los mismos. Arsénico y talio son los ejemplos más clásicos de tóxicos que se alojan en pelo y su determinación permite conocer si un individuo ha sido envenenado.

10. Son variadas las técnicas que permiten determinar el grupo sanguíneo de un individuo con el solo análisis de sus cabellos.

La búsqueda de los aglutinógenos responsables de grupo se realiza fundamentalmente por dos métodos:

- absorción-elución
- anticuerpos radioactivos marcados.

Algunas de las técnicas empleadas utilizan la células de la raíz del pelo y otras trozos del mismo pelo y, en general, dependiendo del tiempo transcurrido y de las condiciones de conservación del pelo, la probabilidad de éxito en la determinación del grupo sanguíneo tiene un máximo del 90 %.³⁵

11. Existen varias patologías y anomalías que pueden afectar a la cabellera, las cuales son importantes desde el punto de vista forense, por cuanto la detección de ella en el análisis del pelo, puede ayudarnos a descartar sospechosos o a sumar antecedentes de cargo.

BIBLIOGRAFIA

1. Química legal, Instituto de Formación profesional. Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal, México: 1999 523-60.
2. Legorreta H y Soto "Determinación de citocinas por RT-PCR". Curso teórico-práctico. 1998. FES ZARAGOZA
3. Lee HC, Gaensslen RE, Bigbee MS, Kearney JJ. "Guidelines for the collection and preservation of AND evidence". Journal of Forensic identification.1999: 41:344-356.
4. Quiroz Cuarón Alfonso."Medicina forense". México 2003. 89;100-103
5. Lee HC Ladd, C, Scherczinger CA, Bourke MT "forensic applications of AND tipyng: collection and preservation of AND evidence". J Forensic Med Pathol.1998: 10-18
6. Ernesto García Marín. Universidad Internacional de América en Cd. Victoria Tamaulipas [29 de septiembre 2003] [12 julio 2008]. La utilización de la prueba de ácido desoxirribonucleico (ADN) para la aplicación de la justicia en México.
<http://www.monografias.com/trabajos14/ácido-desoxi/shtm>.
7. J. W Hicks "DNA profiling a tool for law enforcement" forensic science 1998; 1-5.
8. Knight, B. "Medicina forense de Simson". 2ª, México: Editorial Manual Moderno, 1994: 61-71
9. "La Medicina Legal y forense en los albores del siglo XX, instrumentos de investigación penal" Congreso Internacional"; México 2004
10. Lorente M y Lorente JA "La Medicina Clínica ante los indicios biológicos criminales y la identificación genética clínica":1997: 113-115
11. Gutierrez Chávez Angel; "Manual de Ciencias forenses y Criminalistica"; México 1999; 13-19; 31;47.
12. Martínez."Medicina legal", 16 a, México: Méndez editores. 1991: 181-187
13. Handbook of forensic science" ; EU. 2001; 3a. ed; 64-70; 86,94.
14. "Profiles in DNA; Implementation of a large DNA database; STR data Goes to gurt; NFSTC; Science serving justice; Gene print custom protocols"; May 1998; Vol 2; N° 1.
15. Moreno L. Rafael. "Los indicios biológicos del Delito". Inacipe. México 2003; 89-98
16. J.A Siegel "Forensic Science "; Issues in forensic science; E.U.1998; 36-40; 66,70.
17. Lee H. C. , C. Scherczinger C.A., Bourke MT. "Forensic applications of AND tipyng: collection and preservation of AND evidence"; Journal Forensic Medical pathology; Estados Unidos 1998; 19: 10-18.
18. Raul T/Lic. Benito Almicar Fleita/ Santa Cruz Chile. La Criminalistica [Martes 21 de junio 2007] [10 julio 2008]
<http://www.foropatagonicos+j.gov.ar/Santacruz/doctrinajuridicapatagonica4.htm> Moreno González R. "Los indicios biológicos del delito". México: Editorial INACIPE, 2000: 17-37.

19. Lorente Acosta J. A. Lorente Acosta M. "El ADN y la identificación en la investigación criminal en la paternidad biológica". España 1995 ; 113-115; 118-121
20. Villanueva E, Lorente JA. "Aplicaciones del DNA a la Medicina Legal". Barcelona , editorial : Salvat, 1990; 1044-1050.
21. Saldaña H., López. R., Martínez, A. Y Pérez, D. "Reacción en cadena de la polimerasa" Editorial: Ciencia y desarrollo.1998: 108 (19). 50-60.
22. Mullis, K.. "Reacción en cadena de la polimerasa".Editorial: Investigación y ciencia. 2000:165, 30 – 37
23. Lee H.C. Ladd C. "Preservation and collection of biological evidence": Croahan Medical Journal; Estados Unidos 2001; 43 -48; 225-247.
24. Montiel Sosa J. "Criminalística". México: Editorial: Limusa Noriega-editores, 1993: 85-98
25. Benecke M. B. Sc; "Six forensic entomology cases: description and commentary" Journal of forensic science ; Estados Unidos 1998; 43;85;797.
26. Franco de Ambriz M. "Hematología forense". 3ª. Ed. México: Editorial Porrúa, 1999: 23-81
27. Curtis, H y Barrios S. "Biología" 5ª, ed. Buenos Aires: Editorial Medica panamericana, 1993: 413-414
28. Lee, C.H., Ladd, C. (2001) " Preservation and collection of biological evidence", Croahan. Editorial: Medical Journal. 2001: 43; 225-228
29. Zonderman, J. "Laboratorio de criminalística". México: Editorial Limusa Grupo Noriega-editores, 2000: 69-92.
30. Gutiérrez Chávez A. "Indicios y evidencias". En: Moreno González R "Antología de la investigación criminalística" México: Editorial: INACIPE, 2001 143-146
31. Cirnes Zuñiga Sergio H. "Criminalística y Ciencias forenses"; México 1997; 16-24; 33-40
32. Zonderman John. "Beyond the crime laboratory":
33. the new science of investigation. Estados Unidos 1998; 53; 121-126.
34. Franco M. Hematología forense. México: Editorial Porrúa, 1999: 6-45.
35. Alvarez Diaz Granados Fco. Javier; "Diccionario básico de criminalística: definición de términos aplicables en balística, dactiloscopia, fotografía, grafología, medicina legal, planimetría, psiquiatría, psicología, vocablos afines relacionados con la investigación criminal"; Santa Fe de Bogotá 1998; 10-25; 48, 51;53-56.