



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**ZARAGOZA**

**La genética forense en México su aplicación legal  
y el banco de datos Genéticos**

**Tesina**

**Que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo**

**Presenta:**

**Miguel Angel Tadeo Rangel**

**Asesor**

**M en C Araceli García del Valle**

Dedicatorias.

Con todo mi agradecimiento a mis padres

Rosario Rangel y Miguel Tadeo

Quienes me dieron la vida y aportaron parte de su apoyo y empeño para ayudarme a llegar hasta donde me encuentro ahora.

A mi abuela

Magdalena Sánchez

Quien desde que era un niño me lleno de consejos los cuales me ayudaron mucho para ser la persona que ahora soy.

Con cariño.

A mis hermanos y sobrinos

Janeth, Juan Daniel, Josué y Joselin.

En los cuales espero ser un ejemplo a seguir.

Por su apoyo, comprensión amor, cariño y motivación, con la cual compartí miles de experiencias que me han ayudado a ser mejor persona y que ha estado conmigo en los buenos y malos momentos, a mi futura esposa.

Isha Ortiz García

A mi asesora

M. en C. Araceli García del valle

Por su apoyo, comprensión con la cual no hubiera sido posible este trabajo.

No debes de tenerle miedo a nada en la vida, si ocurre el caso contrario solamente tienes que comprenderlo. Ahora ha llegado el momento de entender más para que así temamos menos.

Marie Curie

## Tabla de contenido

Introducción .....	3
Planteamiento del problema.....	5
Objetivos .....	6
Metodología.....	7
Resultados.....	8
Generalidades del ADN .....	8
Composición química del material genético .....	8
Estructura del ADN .....	9
Propiedades del ADN .....	10
Clasificación del ADN.....	12
Función del ADN.....	13
El ADN y sus aplicaciones forenses.....	16
El lugar de los hechos y levantamiento de indicios .....	17
Tipos de indicios utilizados para el análisis genético forense.....	18
Sangre .....	18
Semen .....	18
Pelo .....	18
Piel .....	19
Saliva .....	21
Manejo de los indicios biológicos.....	22
Precauciones generales que deben de adoptarse durante los procesos de levantamiento y envío de indicios .....	23
Manejo de las muestras .....	24
Extracción del ADN a partir de los indicios.....	26
Papel FTA.....	26
Extracción diferencial .....	27
Análisis de ADN en los laboratorios de Genética forense .....	29
Sistema AB0 .....	29
Análisis de ADN .....	30

Hibridación con sondas o Southern blot .....	30
Análisis de ADN por PCR.....	32
i) Desnaturalización.....	32
ii) Hibridación .....	32
iii) Extensión .....	33
iv) Electroforesis.....	33
Otras tecnologías de análisis forense .....	34
Microchip portátil para electroforesis capilar .....	34
Determinación de STR por hibridación en serie. ....	35
Instrumentos de electroforesis capilar en serie .....	35
Espectroscopia de masas MALDI-TOF .....	36
El banco de datos genéticos.....	38
La Genética forense en México. ....	43
Discusión. ....	47
Conclusiones. ....	49
Referencias Bibliográficas. ....	50
Glosario.....	53

## Introducción

Actualmente las ciencias forenses comprenden una amplia diversidad de disciplinas científicas que trabajan de manera especializada e interdisciplinaria para el cumplimiento de un objetivo en común: asistir al proceso de justicia mediante la evaluación de la evidencia en cualquiera de sus formas, circunscribiendo la aplicación de los conocimientos científicos y tecnológicos dentro de un marco ético.

Debido a la amplia gama de delitos y de evidencias que pueden estar involucrados en una investigación criminal, en principio las ciencias forenses no tienen límites de aplicación, salvo los delimitados por el propio avance del conocimiento científico y tecnológico de la humanidad. Sin embargo, cualquier procedimiento y técnica analítica, antes de ser aplicado a un proceso judicial, debe ser aceptado o reconocido para el campo científico forense.

La diferencia fundamental entre las aplicaciones científicas no forenses y la ciencia forense consisten en que esta última es una especialidad en el aspecto legal y es parte inherente en el ejercicio profesional. La ciencia forense involucra la generación de resultados científica y jurídicamente válidos. Parte del quehacer del científico forense es apoyar a los operadores de la administración de la justicia en la correcta y debida interpretación de los resultados obtenidos durante la evaluación del indicio y delimitar claramente los alcances de las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos.

Entre estas ciencias forenses se encuentra la Genética forense, la cual se basa en el principio de la huella genética “Toda persona tiene una combinación genética única e irreversible. El ADN proporciona esta identidad biológica a los individuos y se puede analizar por diferentes métodos moleculares”.<sup>1</sup>

Es frecuente que en la escena del crimen sean encontradas muestras biológicas como saliva, semen, sangre, pelos y restos de piel bajo las uñas de las víctimas. A partir de estas muestras se puede obtener ADN de la persona de la cual provienen. El desarrollo de técnicas de Biología molecular, permiten un análisis exhaustivo del ADN contenido en estas muestras, esto ha logrado que este tipo de evidencias cobre particular importancia. Ya que con estos se puede correlacionar la evidencia encontrada en la escena del crimen con un sospechoso.

Básicamente, lo que se pretende hacer en este tipo de estudios es comparar el ADN recuperado a partir de la evidencia física con el de los sospechosos. Para esto, debe realizarse un perfil de ADN, utilizando marcadores genéticos que permitan distinguirlas o asociarlas.

En la actualidad la Genética forense estudia el polimorfismo o variabilidad genética humana aplicada a los siguientes problemas judiciales:

- Investigación de la paternidad: Resolución de algún reclamo o exclusión de una reclamación por parte de la madre y/o el hijo.
- Criminalística: Asesinatos, agresiones y delitos sexuales (violación).
- Identificación: Restos cadavéricos o personas desaparecidas.

La utilización de ADN para realizar estos estudios en hechos delictivos, que pueden dejar vestigios biológicos del autor sobre la víctima o el lugar del delito (cabellos, saliva, células de la piel, semen, sangre) sirven para identificar algún individuo por métodos de Biología molecular.

Si todos estos perfiles genéticos fueran almacenados en una base de datos, serían de mucha utilidad, para formar un banco de datos genéticos, ya que podrían utilizarse en el futuro para la investigación de algún delito.

En México, el desarrollo de la Genética forense y de un Banco Nacional de Datos Genéticos facilitaría la investigación y resolución de muchos casos relacionados con la identificación humana.

## Planteamiento del problema

En la criminalística, la Genética forense ha presentado grandes avances, por lo que se ha recurrido a ésta para la resolución de delitos.

El contar con una base de datos de perfiles genéticos permitiría realizar comparaciones y así descartar de manera confiable a personas inocentes en las investigaciones. Así mismo se tendría un fundamento más sólido para la acusación del verdadero responsable, además podrían minimizarse los costos en algunas investigaciones y en su caso también el tiempo.

En México, la legislación aún no contempla que ésta es una herramienta de gran potencial para identificar personas; principalmente porque son técnicas de altos costos. Sin embargo, es importante considerar que si se desea combatir la delincuencia el contar con una base de datos más robusta, sería un gran avance que ayudaría de manera importante para la resolución de delitos.

En el presente trabajo, se recopiló información sobre los avances de la Genética forense y se investigó si se lleva a cabo la recopilación de perfiles genéticos en México, para la creación de un Banco de datos genéticos. Es importante mencionar que a pesar de que las técnicas para recolectar, cuantificar y determinar un perfil genético son de alto costo, es necesario aplicarlas para poder resolver un crimen y así poder aplicar la justicia en la sociedad mexicana.

## Objetivos

- Realizar una investigación bibliográfica en Libros, Revistas de criminalística, páginas de internet sobre la Genética forense y su aplicación en México.
- Analizar las ventajas y desventajas que tiene la creación de un Banco de datos genéticos y su aplicación en México.

## Metodología

El presente trabajo consiste en una investigación de tipo documental. Se llevó a cabo en cuatro etapas que consistieron en:

1. Revisión bibliográfica sobre Genética forense en México, y Banco de datos genéticos.

Fuentes de información:

- Base de datos.
- Libros de Genética forense, de Criminalística.
- Revistas científicas.
- Web.

2. Recopilación y selección de la información relacionada a la Genética forense y los Bancos de datos genéticos.

3. Conjunción de la información seleccionada.

4. Reporte y organización de la información obtenida, para realizar el presente trabajo monográfico.

# Resultados

## Generalidades del ADN

La unidad fundamental de un ser vivo es la célula, cada una de las células que lo conforman tienen núcleo, el cual contiene en su interior el ADN necesario para desarrollarse y cumplir la misión encomendada por la naturaleza. El conjunto del ADN que posee cada célula se denomina genoma. Sin embargo, existen unas células muy específicas, que no tienen núcleo y que, por lo tanto, no poseen ADN, en este caso los eritrocitos.

Según su localización y estructura existen dos tipos de ADN en el organismo, el ADN nuclear, (al cual nos enfocaremos) y el ADN mitocondrial, localizado en el interior de un organelo celular denominado mitocondria<sub>2</sub>.

## Composición química del material genético

El ADN es un ácido nucleico. Está compuesto solo de cuatro moléculas básicas, llamadas nucleótidos, idénticas entre sí, excepto que cada una contiene una base nitrogenada diferente. Ellas determinan la estructura tridimensional del ADN.

Los nucleótidos están constituidos por un anillo heterocíclico de Carbono y de Nitrógeno el cual se le denomina base nitrogenada, un azúcar de cinco átomos de Carbono en forma de anillo denominado pentosa, llamada desoxirribosa, y un grupo fosfato en la posición 5' del azúcar.

Estas bases nitrogenadas son de dos tipos distintos: Purinas, con un anillo de cinco y seis lados fusionados; y Pirimidinas, con un anillo de seis lados. Las cuatro bases son Adenina, Guanina (Purinas); Citosina y Timina (pirimidinas). Normalmente se les refiere por su abreviatura de la base (A, C, G, T). En ausencia del grupo fosfato, la base nitrogenada y la desoxirribosa forman un nucleósido. <sub>2</sub>

La figura 1, muestra una representación gráfica del ADN, sus bases nitrogenadas, sus enlaces y así mismo la pentosa.

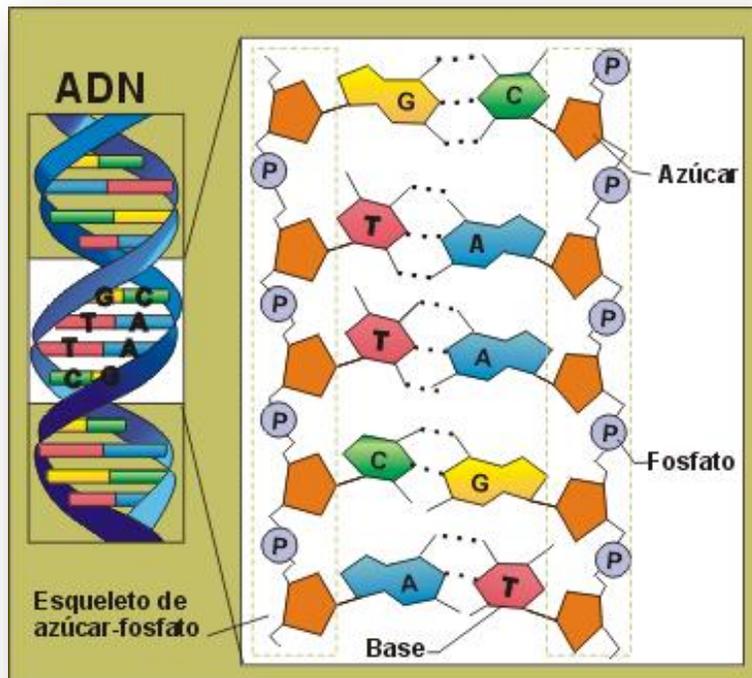


Fig. 1. Imagen estructural del ADN <sub>3</sub>

### Estructura del ADN

En su forma estructural el ADN, se forma a partir de la condensación de los nucleótidos. Esto se lleva a cabo por los enlaces 3'5' fosfodiéster. Formando así el esqueleto de azúcar-fosfato-azúcar-fosfato que se localiza en el exterior de la molécula con las bases proyectándose hacia el centro.

James Watson y Francis Crick en 1953 diseñaron la estructura del ADN, la cual en su trabajo describen como una doble hélice de rotación derecha que se enrolla alrededor del mismo eje la cual se observa en la figura 2. Cada una de las cadenas se encuentra unida

por enlaces de hidrógeno que están presentes entre cada base de una cadena asociada a la base de la otra. Cada par de bases que resulta de la unión de los enlaces de hidrógeno consiste en una purina y una pirimidina, se emparejan de acuerdo a la regla siguiente: Guanina se empareja con Citosina, y Adenina lo hace con Timina. Los pares Adenina-Timina se unen por medio de dos enlaces de hidrógeno mientras los pares Guanina-Citosina lo hacen por tres enlaces de hidrógeno. <sup>2</sup>

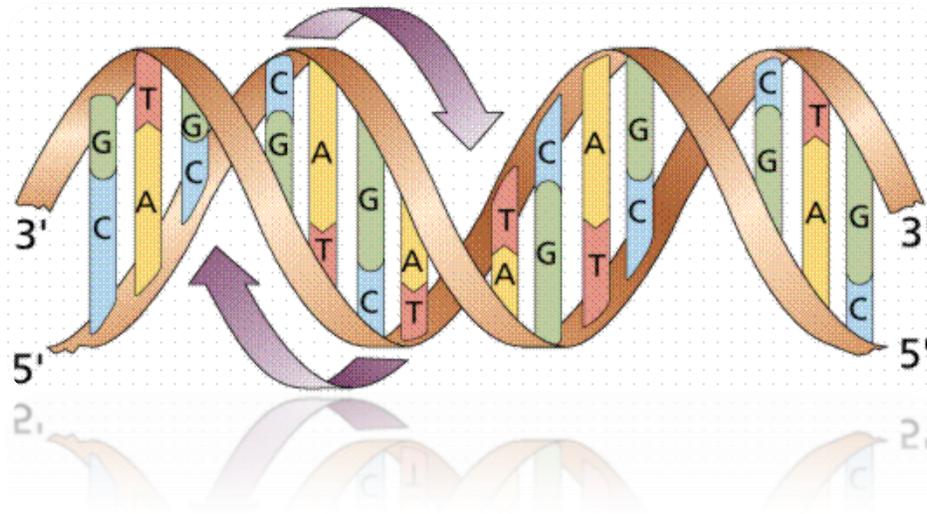


Fig. 2. Representación gráfica de la doble hélice del ADN.<sup>4</sup>

Las dos cadenas forman una doble hélice y las cadenas corren en direcciones opuestas, son antiparalelas, si una de las cadenas va de 5'-3', la otra va en dirección 3'5'.

La doble hélice es dextrógira. El orden en que se unen los nucleótidos, se denomina secuencia.

### Propiedades del ADN

El material genético se duplica con exactitud, ya que las cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno, los cuales son capaces de separarse, sin necesidad de romper enlaces covalentes. La especificidad de las bases permite que cada una de las cadenas sirva como molde para síntesis de una cadena complementaria. Por medio de enzimas denominadas

polimerasas, siempre se obtendrá una copia exacta de la otra cadena, esto permite que la información genética pueda perpetuarse.

El ADN posee la propiedad de hibridarse. Si se les aplica temperatura o tratamiento químico, se pueden romper esos enlaces a este proceso se le llama desnaturalización.

La desnaturalización es un proceso reversible, si un fragmento de ADN se calienta se separan sus dos cadenas, pero si se disminuye la temperatura, las cadenas de ADN encontrarán a su complementaria y se unirán mediante el proceso llamado renaturalización.<sup>5</sup>

Cuando el ADN se enrolla para su empaquetamiento celular, se forma la cromatina, su componente proteico principal son las histonas, que son las que se encargan de enrollar al ADN. Esto a su vez forma a los cromosomas como se presenta en la figura 3.

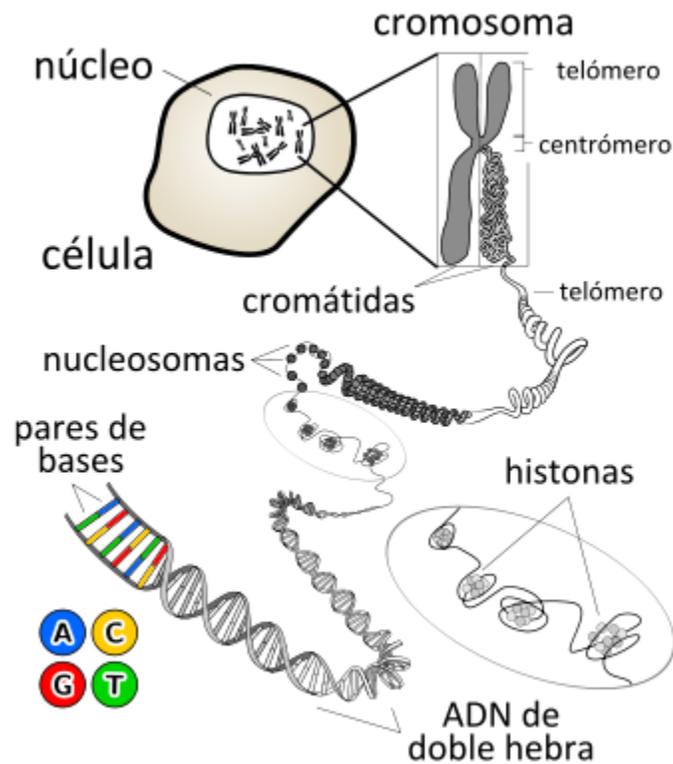


Fig. 3. Representación grafica del empaquetamiento celular del ADN. <sup>6</sup>

## 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, en este existe muy poca variabilidad entre las personas a excepción de las regiones del sistema HLA el cual es un conjunto de moléculas implicadas en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario.

b) ADN no codificante. También llamado ADN repetitivo, son secuencias cortas repetidas en forma de copias idénticas. Entre éstas hay dos clases.

- ADN moderadamente repetitivo. Se le llama elementos interespaciadores repetitivos.

- ADN altamente repetitivo, está formado por cortas secuencias que se encuentran repetidas en tándem (STR), debido a su corto tamaño la secuencia se puede definir como VNTR o STR dependiendo del tamaño.

La longitud de éstos puede variar desde 2 hasta 300 pares de bases, a estas secuencias en tándem se les llama ADN satélite, éste se localiza en la heterocromatina constitutiva de los cromosomas, en particular en los centrómeros.

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 cambios mínimos que tienen lugar, cuando son viables, aumentan el polimorfismo de proteínas y enzimas, aunque también pueden tener efectos negativos. 7

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. 8

### **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.).

El ADN participa en la producción de proteínas, el ADN dirige la síntesis del ARN; el ARN dirige la síntesis de proteínas y, finalmente, una serie de proteínas específicas catalizan la síntesis tanto del ADN como del ARN. 9

Las instrucciones para construir las proteínas están codificadas en el ADN y las células tienen que traducir dicha información a las proteínas. El proceso consta de dos pasos principalmente que son la transcripción y otro es traducción. 9

La transcripción es el proceso durante el cual la información genética contenida en el ADN se transforma a ARN de una sola cadena el cual puede salir del núcleo de la célula, manteniendo así resguardado el ADN, a este se le llama ARNmensajero. La transcripción es catalizada por una enzima llamada RNA-polimerasa. 9

Además de la secuencia de nucleótidos que codifican proteínas, el ARN mensajero copia del ADN inicial unas regiones que no codifican proteínas y que reciben en nombre de intrones. Las partes que codifican proteínas se llaman exones. Por lo tanto, el ARN inicialmente transcrito contiene tanto exones como intrones. Sin embargo, antes de que abandone el núcleo para dirigirse al citoplasma donde se encuentran los ribosomas, este ARN es procesado mediante operaciones de "corte y empalme", eliminándose los intrones y uniéndose entre sí los exones a este se llama ARNmaduro y es el que emigra al citoplasma de la célula. En ese proceso participa también ARNtransferencia que se une específicamente a cada uno de los 20 aminoácidos y el transporte al ribosoma para incorporarlos a la cadena polipeptídica en crecimiento, y el ARNribosómico que conjuntamente con las proteínas ribosómicas constituye el ribosoma. 9

Por último se da la traducción que es donde la secuencia de ARN da las instrucciones para que se construya una secuencia de aminoácidos y por ende la producción de una proteína.

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Son imprescindibles para el crecimiento del organismo. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan:

- Estructural. Esta es la función más importante de una proteína por ejemplo el colágeno.
- Inmunológica como son los anticuerpos.
- Enzimática por ejemplo la sacarina y la pepsina.
- Contráctil por ejemplo la actina y la miosina.
- Homeostática.
- Transducción de señales.
- Protectora por ejemplo la trombina y el fibrinógeno. 9

El genoma humano consta de unos 3000 millones de pares de bases. Solo el 5 por ciento del ADN humano es codificante, o sea forma parte de los genes. El 98 por ciento restante es no codificante y tiene funciones estructurales y reguladoras. En esta parte del ADN es donde se encuentra la variabilidad genética entre individuos, ya que sus mutaciones no están tan sometidas a una selección tan fuerte como las que ocurren en el codificante ya que en este si se presenta una mutación puede haber consecuencias fenotípicas importantes. La mayoría del ADN no codificante está constituido por ADN repetitivo, entre éstos se encuentran los STR (secuencias repetidas en tándem), este tipo de secuencias se repiten una detrás de otra un número variable de veces. De acuerdo a su tamaño se les denomina de diferentes formas (satélites, mini satélites, microsatélites).<sup>10</sup>

De acuerdo al lugar que ocupa una secuencia en el cromosoma se le llama locus. En una célula humana cada locus se encuentra por duplicado, uno en el cromosoma de origen paterno y otro en el cromosoma de origen materno. A cada una de las distintas formas alternativas que ocupan un locus se le denomina alelo. Cuando un individuo presenta en el locus paterno un alelo distinto al presente en el locus materno se dice que es heterocigoto para ese locus, mientras si se ha heredado el mismo alelo se llama homocigoto. A la caracterización de los alelos presentes en un determinado locus se le denomina genotipo.

Los genes son los encargados de la herencia, Mendel definió en sus leyes que el gen es un factor que pasa inalterado de los padres a la descendencia.

Un perfil genético es la combinación de los genotipos obtenidos para múltiples loci. En el caso del ADN que sólo está presente en estado haploide y que por tanto todos sus loci se heredan siempre de forma conjunta (por ejemplo el cromosoma Y de herencia paterna) a esta combinación se llama haplotipo.

## El ADN y sus aplicaciones forenses

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.).

Cada ser humano tiene una combinación única e irreversible de este material genético. En un hecho delictivo siempre el responsable dejará un rastro biológico el cual se puede identificar, una de estas formas es por medio del análisis del ADN.

Gracias a los avances en la Genética que se han aplicado al ámbito forense, se ha convertido en una de las herramientas más útiles para la identificación humana. Debido a que solo se requieren muestras pequeñas de material biológico, y que es más estable que otros marcadores biológicos tradicionales y que es un método preciso, se ha contribuido a que esta área de las ciencias forenses evolucione rápidamente.

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.

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. <sup>11</sup>

## El lugar de los hechos y levantamiento de indicios

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.

Es evidente que, pese al potencial de la prueba, el estado en el que llegan los indicios biológicos al laboratorio es crucial: si los indicios no han sido bien recogidos o conservados (por ejemplo, porque han sido contaminados por un ADN extraño) la posibilidad y el rendimiento del análisis se reduce. Por eso la recogida de indicios ha de hacerse con sumo cuidado, y el mantenimiento de la cadena de custodia es fundamental para que los indicios no pierdan su valor probatorio. Llama la atención a este respecto el entusiasmo con el que muchos países se han abierto a las pruebas científicas (particularmente a las de ADN) sin un marco normativo previo que regule los procedimientos de obtención y conservación de los datos y garantice en consecuencia la fiabilidad de los resultados.<sup>12</sup>

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 los 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.<sup>8</sup>

## Tipos de indicios utilizados para el análisis genético forense

### 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.

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. <sup>13</sup>

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 roseado o salpicadura.

El determinar el grupo sanguíneo sirve también como primer paso para la exclusión de sospechosos, antes de un análisis de ADN.

### Semen

El semen aplica principalmente cuando se trata de delitos sexuales. El esperma se puede encontrar como mancha o fluido sobre las ropas, sobre el propio sospechoso o sobre la víctima, esta constituido por fructuosa, prostaglandinas (E2, A, B), aminoácidos, fósforo, potasio, hormonas. Una célula espermática contiene un alto contenido de material genético por lo que es una prueba bastante significativa para resolver delitos sexuales. El líquido espermático también está constituido por espermatozoides, células propias del epitelio uretral y plasma seminal. <sup>7</sup>

### 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 noventa y un por ciento 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.

El bulbo reviste un gran interés médico-legal y criminalístico, la presencia de éste hace posible diferenciar un pelo caído de uno arrancado espontáneamente. 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.

La parte más alejada del cuero cabelludo está formada por células que tienen ocupado su citoplasma totalmente por una proteína estructural llamada queratina que da su forma al pelo. Por tanto, en esta zona distal, las células carecen de núcleo y de ADN. Sin embargo, en la zona proximal (bulbo o raíz), el pelo presenta células nucleadas totalmente activas que contienen ADN.<sup>5</sup>

Es imprescindible que los pelos encontrados en la escena del crimen presenten bulbo si lo que queremos es realizar un estudio de ADN nuclear. Pero no todos los pelos con bulbo son susceptibles de análisis de ADN nuclear, por lo que es necesario realizar una selección previa a la analítica molecular, simplemente visualizándolos al microscopio. Dentro del conjunto de pelos que tengan bulbo existen algunos que son mejores que otros para los estudios de ADN. Los pelos que aún se encuentran en fase de crecimiento presentan bulbo activo rico en células y por ello son idóneos para los estudios de ADN. Los pelos caducos no presentan tal actividad y por ello no se obtienen resultados positivos en los análisis.<sup>7</sup>

## Piel

La piel protege la red de músculos, huesos, nervios, vasos sanguíneos y todo lo que hay dentro de nuestro cuerpo. Nuestros párpados tienen la piel más fina y las plantas de los pies, la más gruesa. Debido a que tiene núcleo, a diferencia de las células hemáticas, estas son una fuente adecuada para estudio de ADN.

Este tipo de muestras se analiza principalmente de restos cadavéricos ya que en los cadáveres es difícil obtener una muestra hemática.

De los restos cadavéricos se analiza principalmente los órganos ya que son los que tardan más tiempo en descomponerse.

Además, la incapacidad de extraer ADN a partir de tejidos blandos cuando el período post mortem es muy largo se debe a que el ADN de dichos tejidos puede degradarse de tal manera que no será lo suficientemente largo ni siquiera para un análisis de ADN por PCR. Se ha demostrado que el ADN es bastante más estable en el hueso compacto y por ello es preferible recurrir a este tipo de muestras en la identificación de cadáveres, a pesar de que la extracción convencional de ADN en hueso es bastante más laboriosa que en tejido blando.

Los restos óseos son útiles para obtener ADN de cadáveres los cuales ya están en proceso de putrefacción o esquelitización.

El tejido óseo está compuesto por sales de calcio precipitadas, fundamentalmente en forma de cristales de hidroxiapatita y por una parte orgánica, colágeno, mucopolisacáridos sulfatados y algunas glucoproteínas. Las células óseas que se obtienen de este tipo de indicios son las que se encuentran en donde hubo más actividad celular ya que son las que tienen mayor contenido de ADN (médula ósea). Los huesos con abundante médula son el fémur, la tibia, húmero, esternón o costilla.<sup>7</sup>

Los dientes ofrecen una estupenda fuente de ADN. La corona anatómica del diente está recubierta por un tejido inerte, duro y acelular denominado esmalte. Este es el tejido más altamente mineralizado que existe en el organismo: un 96 por ciento de contenido inorgánico (hidroxiapatita como en el caso de los huesos) y un 4 por ciento de material orgánico y agua. <sup>7</sup>

La mayor cantidad de células nucleadas (y por tanto de ADN) en el diente, se encuentra situada precisamente en la zona más interna de los dientes (pulpa), rodeadas por una dura matriz inorgánica que le proporciona una eficaz protección a todos los agentes externos químicos, físicos y biológicos. Si bien puede haber contaminantes en la superficie del diente, una vez limpia, se ha de proceder a la apertura de la pieza y a la observación del estado del tejido pulpar; si presenta signos aún de vitalidad se puede realizar una extracción de ADN sólo con ese tejido, pero si la cavidad pulpar está ya vacía o el tejido pulpar está en malas condiciones, se puede realizar una trituración a baja temperatura de las partes duras del diente, pues pueden aportar ADN suficiente como para realizar un análisis en condiciones adecuadas. <sup>7</sup>

## 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.

La saliva en si no presenta contenido celular, pero la saliva se encuentra en un medio lleno de células epiteliales (epitelio bucal). Estas células se desprenden y llegan a formar parte de la saliva, por ejemplo de un chicle o de una colilla de cigarrillo se pueden encontrar células adheridas que se han desprendido del epitelio labial o células que fueron arrastradas por la saliva.

## Manejo de los indicios biológicos.

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. Este tipo de contaminación se produce por la presencia, en la escena del delito o en el cuerpo de la víctima, de indicios biológicos no relacionados con los hechos y puede ser anterior o posterior a la producción de los mismos. La contaminación biológica anterior a los hechos se debe a la presencia de material biológico humano previo a la producción del delito, por lo que es inevitable. Suele ser frecuente en algunos tipos de muestras como por ejemplo las toallas o los paños de cocina, que son muestras en las que por su propia función suelen encontrarse restos de células epiteliales, manchas de sangre, sudor, etc. Otras muestras en las que también es frecuente que exista una contaminación previa a los hechos son las tapicerías, alfombras, fundas de asientos en los coche, etc. Por ello es muy importante establecer el valor de los indicios recogidos en este tipo de muestras y de los resultados obtenidos a partir de ellos.<sup>14</sup>

En el cuerpo de la víctima también podemos encontrar material biológico anterior a la producción de los hechos. Por ejemplo es posible que personas que sufren una agresión sexual hayan mantenido relaciones consentidas previas, por lo que podemos encontrar restos de semen anteriores a la agresión.

La contaminación biológica posterior a los hechos se debe al depósito de material biológico humano con posterioridad a la producción del delito, por lo que puede ser evitable. Este tipo de contaminación puede estar producida por personas ajenas a la investigación como curiosas, familiares, testigos, etc. Es relativamente frecuente ver, en la escena del crimen, a familiares fumando o a testigos reproduciendo los hechos y tocando pruebas. Para evitar la contaminación es fundamental aislar rápidamente la escena del delito y mantener a los familiares y testigos, fuera de ella. Sin embargo, este tipo de contaminación también puede estar producida por personas que colaboran en la investigación y que de forma accidental o por desconocimiento dejan indicios en el lugar de los hechos o en el cuerpo de la víctima. En estos casos la contaminación se debe fundamentalmente a las personas que realizan la recogida y no mantienen las mínimas precauciones como son el uso de guantes (para evitar la contaminación por células descamadas de la piel), mascarillas (para evitar la contaminación por saliva al hablar o toser), material desechable de un solo uso (para evitar mezclas de fluidos, etc., o bien, a defectos en el empaquetado de las muestras en caso de que las muestras pertenecientes

al sospechoso se envían junto con las de la víctima, habrá que extremar las precauciones para que no exista la posibilidad de una contaminación cruzada. 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. <sup>15</sup>

En el proceso de degradación de las muestras tiene lugar por el desarrollo de microorganismos que degradan los indicios biológicos. Suele estar favorecida por las condiciones de humedad y altas temperaturas y es problemática porque produce la degradación del ADN. Los procesos de putrefacción pueden ser:

Inherentes a la propia muestra por efecto de la antigüedad o de las condiciones ambientales, lo cual es inevitable.

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

También, son susceptibles a este tipo de contaminación los indicios líquidos (sangre, orina, líquido amniótico, etc.) y los órganos y restos de tejidos blandos. Este tipo de muestras deben mantenerse y enviarse refrigeradas al laboratorio, para evitar que se establezcan o desarrollen los procesos de putrefacción. <sup>16</sup>

### **Precauciones generales que deben de adoptarse durante los procesos de levantamiento y envío de indicios**

Una vez vista la problemática derivada de los procesos de recogida y envío de muestras, se describirán las medidas básicas que deben adoptarse para proteger tanto a la muestra como al personal encargado de realizar dichos procesos. En este sentido no hay que

olvidar que siempre que se manipula material biológico es prudente asumir que este tipo de material puede ser una posible fuente de infección y contener patógenos peligrosos.

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

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

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

- Usar guantes limpios, que deben cambiarse con frecuencia.
- Evitar hablar, toser o estornudar sobre las muestras. Usar mascarilla siempre que sea posible. Usar bata y otro tipo de ropa protectora (gorro, calzas... etc.) cuando sea necesario.
- Utilizar instrumental desechable (de un solo uso) siempre que sea posible o limpiarlo frecuentemente.
- Dejar que las muestras sequen a temperatura ambiente, en un lugar protegido, antes de empaquetarlas para su envío definitivo al laboratorio. No utilizar aire caliente ni dejar secar las muestras al sol.
- Empaquetar las muestras en bolsas de papel o cajas de cartón, evitando utilizar plástico.
- Empaquetar las muestras por separado y si es posible en recipientes precintados, de cierre irreversible o en doble envase. Si no se pueden empaquetar por separado, es fundamental separar las muestras indubitadas y las dubitadas y las muestras de distinto origen, víctima y sospechoso.
- No añadir conservadores cuando las muestras sean para estudios de identificación genética.

Una vez terminada la recolección de muestras, guardar todo el material desechable utilizado (guantes, pipetas, papeles...) en bolsas de basura o contenedores, para eliminarlo posteriormente siguiendo las normas de destrucción de residuos vigentes. <sup>10,18</sup>

## Manejo de las muestras

Se denomina gestión de muestras a todos los procesos que conlleva a la manipulación de las muestras desde su toma hasta su destrucción o devolución y cuyo control asegura su integridad y fiabilidad.

Mientras que la cadena de custodia es el conjunto de documentos escritos donde queda registrada la gestión de las muestras desde su toma hasta su destrucción o devolución. En estos documentos deben quedar bien reseñadas todas las manipulaciones que se realizan sobre las muestras y quien las realiza. Por ello, tanto en los formularios como en los recipientes, debe existir un apartado dedicado a la cadena de custodia en los que debe constar, al menos:

El nombre o identificación de la persona que realiza la recogida y su firma, así como la fecha, hora y lugar en que se realiza el levantamiento del indicio. <sup>10</sup>

## Extracción del ADN a partir de los indicios

Una muestra biológica obtenida de una escena del crimen en forma de mancha, ya sea, de sangre o de semen, de sangre líquida de un sospechoso o un problema de paternidad contiene un sin número de sustancias además del ADN. Una molécula de ADN puede ser separada de otros materiales celulares y posteriormente ser examinado. Las proteínas celulares que empaquetan y protegen al ADN en el medio ambiente de la célula pueden inhibir la habilidad para analizar el ADN. Por esto, los métodos de extracción son desarrollados con la capacidad para separar proteínas y otros materiales celulares de las moléculas de ADN. En resumen, la cantidad y calidad del ADN frecuentemente necesita de ser cuantificada prioritariamente a la aplicación de procedimientos analíticos para optimizar resultados. <sup>10,18</sup>

Existen diversos procedimientos de extracción, que deben cumplir con la misión de extraer y purificar el ADN. Entre las que se encuentran: La extracción orgánica, extracción con Chelex, y con papel FTA. La extracción exacta o aislamiento del ADN varia dependiendo del tipo de evidencia biológica o condición de la misma al ser examinada. <sup>19</sup>

1. La extracción orgánica, algunas veces referida como extracción fenol-cloroformo, fue usada por un largo periodo de tiempo y sigue siendo utilizada en situaciones en donde se requiera tipificación por RFLP o PCR. El ADN de alto peso molecular es esencial para métodos RFLP, y puede ser obtenido más eficientemente por este tipo de extracción.

2. El método Chelex de extracción para ADN es más rápido que la extracción orgánica. La extracción Chelex involucra pocos pasos y nulas oportunidades de contaminación de muestra a muestra. Sin embargo, este proceso involucra la obtención de ADN de una sola cadena y por esto es solamente una herramienta para procedimientos de amplificación por PCR-base. <sup>20</sup>

### Papel FTA

Un procedimiento relativamente nuevo de extracción de ADN involucra el uso de papel FTA™. Este es un papel absorbente a base de celulosa que contiene cuatro sustancias químicas para proteger las moléculas de ADN de la degradación de las nucleasas y preservar el papel de contaminación bacteriana. Como resultado el ADN en el papel FTA™ es estable a temperatura ambiente durante un periodo de muchos años.

El uso del papel FTA™ simplemente involucra la adición de una gota de sangre en el papel y el posterior secado de la mancha. Las células son lisadas al contacto con el papel y el

ADN de los leucocitos queda inmovilizado en la matriz del papel. Una pequeña parte del papel con muestra de sangre seca es removido y colocado en un tubo para su lavado. El ADN contenido puede ser purificado con lavados con disolventes que remuevan el grupo hemo y otros inhibidores de la reacción de PCR. La purificación es visualizada durante los lavados porque el color rojo del papel es removido en el sobrenadante. El pequeño pedazo de papel purificado es adicionado a la reacción de PCR directamente.

En situaciones donde se necesitan múltiples ensayos de la misma muestra, el papel purificado puede ser reusado para amplificación y tipificación secuencial del ADN. <sup>20</sup>

### Extracción diferencial

La aplicación de las técnicas de estudio de polimorfismos ADN ha superado muchos de los problemas que se planteaban con el uso de marcadores convencionales, pero también se enfrentaba a sus propias limitantes.

Una de sus mayores ventajas es que ofrece la posibilidad de resolver las mezclas de semen con otros fluidos biológicos procedentes de la víctima (fluidos vaginales, sangre o saliva), gracias a un método de extracción conocido como “lisis diferencial”, que se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergente y proteinasa K en ausencia de un agente reductor. En un primer paso, la muestra se incuba en una disolución con SDS y proteinasa K, y produce la rotura de las células epiteliales, pero no de los espermatozoides, que pueden recuperarse por centrifugación. En el sobrenadante de esta primera digestión queda el ADN procedente de la víctima. El precipitado que contiene los espermatozoides íntegros, tras varios lavados se incuba de nuevo en una solución con SDS y proteinasa K, añadiendo esta vez el agente reductor ditioneitol (DTT). Tras la digestión, esta segunda fracción contiene el ADN de los espermatozoides.

Aunque la extracción diferencial resuelve las mezclas de semen con otros fluidos, no es de utilidad cuando el esperma procede de un individuo azoospermico o vasectomizado. <sup>8,18</sup>

Todas las muestras deben ser cuidadosamente manipuladas independientemente del método de extracción de ADN para evitar la contaminación entre muestras. El proceso de extracción es probablemente donde la muestra es más susceptible a la contaminación en el laboratorio que en otras etapas del proceso de tipificación del material genético. Con la extracción se debe conseguir aislar y purificar el ADN, dejándolo disponible para los posteriores análisis identificativos. Si no se hace correctamente se puede acarrear sustancias contaminantes (químicos o biológicos) que luego pueden impedir la acción de enzimas diversas (restricción o polimerasas) imposibilitando completamente los estudios.

El ADN extraído es conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o entre  $-80^{\circ}\text{C}$  por un largo periodo de tiempo, para prevenir la actividad de las nucleasas. Las nucleasas son enzimas que degradan el ADN. Estas enzimas necesitan magnesio para trabajar apropiadamente por lo que otra de las medidas para prevenir la digestión del ADN en la sangre es el uso de tubos colectores de tapón lila que contienen un conservador sanguíneo conocido como EDTA. El EDTA quela, o enmascara, todo el magnesio libre y esto previene la destrucción del ADN por las nucleasas en las muestras de sangre. <sup>21,22,23</sup>

## Análisis de ADN en los laboratorios de Genética forense

### Sistema ABO

Al principio, las investigaciones forenses se centraban en el estudio de antígenos eritrocitarios (sistema ABO, Rh, MN) mediante técnicas de aglutinación, y de proteínas y enzimas (PGM, globulina Gc, haptoglobina, alfa-2 HS, etc.) mediante técnicas electroforéticas de enfoque isoelectrico.

Las manchas de sangre encontradas en la escena de un crimen se han constituido como un elemento esencial en la resolución de investigaciones judiciales ya que, establecer su origen y grupo sanguíneo, aporta información útil en el proceso de inclusión o exclusión de sospechosos o víctimas. Posteriormente, se realiza un análisis de ADN por los métodos que estudiaremos más adelante.

Un método muy empleado de clasificación de la sangre es el sistema ABO en el que, según los antígenos que se encuentren en la membrana de los eritrocitos, logran clasificarse en distintos tipos:

- Tipo A: los glóbulos rojos expresan antígenos de tipo A en su superficie.
- Tipo B: los glóbulos rojos tienen antígenos de tipo B en su superficie.
- Tipo O: los glóbulos rojos no expresan ninguno de los dos antígenos (A o B) en la superficie.
- Tipo AB: los glóbulos rojos expresan ambos antígenos en su superficie.

El examen para determinar el grupo sanguíneo consiste en mezclar la sangre con anticuerpos contra sangre tipo A y tipo B y ver si los glóbulos rojos se aglutinan. Si dichos glóbulos se aglutinan, eso significa que la sangre ha reaccionado con uno de los anticuerpos, dependiendo de con cual de ellos se aglutine la sangre es de un tipo u otro:

- Suero anti-A la sangre es de tipo A.
- Suero anti-B la sangre es de tipo B.
- Sueros anti-A y anti-B la sangre es de tipo AB.
- Los glóbulos rojos no se pegan o aglutinan cuando se agrega suero anti-A y anti B por lo que la sangre es de tipo O.

De esta forma se puede determinar con precisión el tipo de sangre de una persona. Pero con ello no podemos identificar a una persona concreta, hay muchas personas con el

mismo tipo sanguíneo, por lo que solo se puede excluir a un individuo. Por ejemplo sólo se logra excluir a un sospechoso si su sangre no coincide con la encontrada en la escena del crimen y supuestamente perteneciente al asesino pero si coincide no podemos asegurar que sea el culpable del crimen. <sup>24,25,26</sup>

## **Análisis de ADN.**

Con el estudio del ADN y de su estructura comenzaron a desarrollarse nuevas técnicas de análisis, que conforman lo que hoy se conoce como Genética forense.

La información genética está contenida en la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN), formada de nucleótidos que se repiten millones de veces con una estricta periodicidad. El ADN repetido lo puede estar en tándem o de forma dispersa en el genoma. Es particularmente interesante el ADN repetido en tándem clasificado como minisatélite o microsatélite (STR's, short tandem repeats). Los STR's tienen de 2 a 7 pares de bases y son muy abundantes en todo el genoma, además de que son extremadamente polimórficos poseen una herencia mendeliana simple, lo que los hace muy adecuados para la tipificación de individuos en el área forense. Las ventajas de estos marcadores genéticos son su estabilidad y la posibilidad de amplificación simultánea hasta 16 loci microsatélites a partir de cualquier vestigio biológico aún en cantidades traza, muy degradados o antiquísimos.<sup>26</sup>

Estos marcadores se han convertido rápidamente en la herramienta legal y forense que aporta confiabilidad a los resultados y rapidez al proceso de investigación.

El ADN que se analiza puede ser: cromosómico, mitocondrial o del cromosoma Y.

Se han utilizado diferentes métodos para analizar los polimorfismos del ADN que constituyen la "huella genética" de cada individuo.

## **Hibridación con sondas o Southern blot**

Al principio se utilizó esta técnica para el análisis de ADN. Esta técnica consta de las siguientes etapas:

1. Digestión de la muestra de ADN de alta molecularidad con enzimas de restricción.
2. Separación de los fragmentos obtenidos según su peso molecular mediante una electroforesis en gel de agarosa.

3. Desnaturalización de los distintos fragmentos.
4. Fijación de los fragmentos mediante calor a una membrana de nitrocelulosa o nylon.
5. Prehibridación con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana.
6. Marcaje radiactivo de la sonda (con <sup>32</sup>P frecuentemente) que contiene la secuencia complementaria al fragmento que queremos identificar.
7. Hibridación de la sonda marcada y desnaturalizada con los fragmentos de ADN fijados a la membrana; la sonda se adhiere al fragmento de ADN en la membrana que contiene las bases complementarias y que es el que nos interesa identificar.

Estas sondas pueden ser:

- Sondas mono-locus (SLP): son específicas para una región de un determinado cromosoma, uniéndose a secuencias largas de nucleótidos. Como resultado se observan una o dos bandas por individuo, dependiendo de si éste es homocigoto o heterocigoto.
- Sondas multi-locus (MLP): hibridan con secuencias minisatélites presentes en varios loci de diferentes cromosomas. Como resultado se observan de 10 a 20 bandas por persona (ADN fingerprint). 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.

8. Lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda o aquellas que han hibridado mal.
9. Revelado en una placa radiográfica e interpretación de los resultados.

El análisis mediante hibridación con sondas es muy útil en estudios de paternidad; pero no así en casos de criminalística porque la cantidad de ADN requerida es bastante elevada (entre 20-100 ng) y, además, el tiempo de análisis es de dos o tres días.<sup>27,28</sup>

## Análisis de ADN por PCR

Actualmente se utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las dificultades presentadas por el método anterior fueron superadas gracias a la invención de esta técnica, ideada en 1989 por Kary B. Mullis (Nobel de Química 1993).

Esta reacción permite amplificar un gran número de veces un ADN, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. De esta manera, pruebas tan pequeñas como son una mancha de sangre o de semen o un pelo con raíz, pueden servir para llevar a cabo la identificación genética del individuo al que pertenecen.

La multiplicación se lleva a cabo en un termociclador en etapas sucesivas, las cuales constan de los siguientes pasos:

### i) Desnaturalización

Se somete al ADN a temperaturas de 94-96° C durante unos minutos para romper los puentes de hidrógeno intracatenarios y separar así las dos hebras de ADN por completo.

### ii) Hibridación

Se disminuye la temperatura hasta los 45-65° C y se adicionan los cebadores ó primers de 20 nucleótidos que, si se han elegido adecuadamente, se unirán a las secuencias que flanquean el fragmento a amplificar. Primers de mayor longitud no aumentan el rendimiento y los de menor longitud carecen de suficiente especificidad. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) a la que debe llevarse a cabo la hibridación depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. Una forma simple de calcularla es la siguiente:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su  $T_m$  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. Algunas consideraciones adicionales que deben tenerse en cuenta a la hora de elegir los primers son:

- 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 por ciento).
- 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, ni en el centro ni en los extremos 3'.

### iii) Extensión

A una temperatura de aproximadamente 72°C, la enzima Taq polimerasa (aislada a partir de la bacteria termófila *Thermus Aquaticus*) cataliza de manera muy efectiva la reacción de unión de nucleótidos en el extremo 3' del cebador, utilizando como molde la hebra de ADN. La reacción debe llevarse a cabo en un buffer de KCl, TRIS y MgCl<sub>2</sub>, ya que los iones Mg<sup>2+</sup> actúan como cofactores de la polimerasa. Los nucleótidos empleados son dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfato) y no deben añadirse en gran concentración porque inhibirían la reacción al no tener la Taq polimerasa magnesio suficiente para añadirlos al cebador.

### iv) Electroforesis

Una vez fuera del termociclador, para distinguir entre varias moléculas, primeramente se lleva a cabo una separación para extraer los diferentes tamaños de los fragmentos de amplificación. La separación es comúnmente realizada por un proceso conocido como electroforesis sobre un soporte de gel o dentro de un capilar.

La separación que se lleva a cabo por la PCR puede producir 20 o más fragmentos de ADN que pueden determinarse de una u otra forma. En concreto, la resolución de una sola base es requerida para distinguir entre alelos de área muy limitada. (Por ejemplo, del locus TH01 los alelos 9.3 y 10). El rango de longitud de una separación típica donde la resolución es de una sola base es necesario estar entre 100 y 400 pb. Adicionalmente, es importante que el método de separación sea reproducible y con rendimientos que puedan ser comparados con otros laboratorios. <sup>18</sup>

Este proceso de electroforesis se basa en la carga eléctrica que presentan las moléculas; en el caso del ADN, los grupos fosfato del esqueleto de la molécula tienen carga negativa. Bajo la influencia de una corriente eléctrica, las moléculas de ADN van a migrar del electrodo negativo, conocido como el cátodo, hacia el electrodo positivo, conocido como ánodo. El movimiento de los iones en el campo eléctrico genera calentamiento. Este calentamiento puede ser disipado o absorbido por el sistema. El excesivo calor puede generar bandas no deseables o en severos casos el gel puede literalmente fundirse. La electroforesis capilar tiene la ventaja de que el calor puede disiparse más fácilmente a través del capilar, el cual tiene una gran área en relación al volumen.<sup>29,30</sup>

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. No obstante, 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 muestra tiene contaminantes, que pueden irse amplificando a la vez que el fragmento de interés. En estos casos es

conveniente diluir la muestra hasta que la interferencia de estos contaminantes sea mínima, pero asegurándonos de que no se está por debajo del límite de detección de esta técnica.<sup>5,31,32</sup>

En definitiva, la PCR ofrece una serie de ventajas, frente a las técnicas de análisis genético utilizadas con anterioridad, como son:

- 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. <sup>33</sup>

## Otras tecnologías de análisis forense

### Microchip portátil para electroforesis capilar

La ventaja de analizar ADN en un equipo portátil en miniatura de electroforesis capilar (EC) es que debido a las pequeñas dimensiones de los canales, o capilares, permiten realizar aún más rápidamente una mejor separación de ADN. En lugar de utilizar un tubo capilar de vidrio de 30 cm de largo para hacer la separación del material genético, el microchip portátil de EC tiene un portaobjetos microscópico típico de vidrio con diminutos canales gravados en el que son de 10-50  $\mu\text{m}$  de profundidad por 50  $\mu\text{m}$  de ancho y diferentes cm de largo.

La separación es de 10 a 100 veces más rápida en el microchip CE que en la electroforesis capilar convencional. Usando solo 2 cm de distancia de capilar (comparado a los 36 cm del capilar utilizado en el ABI 310), los alelos tetranucleotídicos de los STR son separados en tan solo 30 segundos. El sistema de microchip de EC esta siendo actualmente desarrollado con un formato de detección multicolor. Estos sistemas fueron hechos compatibles eficazmente con kits de STR comerciales.

También, se han desarrollado microchips de electroforesis con capilares en serie con microplatos que tiene grabados 96 canales separados para aumentar el grado de muestras procesada al mismo tiempo. Estos equipos portátiles tienen la capacidad de separar 96 muestras diferentes en tan solo 2 minutos. La información de genotipificación puede generarse por consiguiente a una velocidad de menos de dos segundos por muestra.<sup>15</sup>

### **Determinación de STR por hibridación en serie.**

Nanogen INC. está desarrollando un microchip, basado en una serie de experimentos que prometen representar la determinación de alelos STR rápidamente. Estos ensayos involucran el uso de un microchip de silicón compuesto de un grupo en serie de electrodos que actúan de manera independiente en los sitios de prueba. Un potencial eléctrico es dirigido directamente al sitio de prueba, el cual contiene una sonda única de ADN para hibridización.

La hibridización en serie de ADN se inicia con la aplicación de la muestra de ADN sobre el chip, después se realizan un par de lavados y se observa de donde se enlaza el ADN sobre la serie de sondas que contiene. La muestra amplificada por PCR va a unirse o hibridarse con su sonda de secuencia complementaria. Una “descarga eléctrica” es aplicada al sitio de cada sonda por un simple ajuste en el campo de energía eléctrica. Las muestras que no son perfectamente enlazadas a la sonda van a ser desnaturalizadas y van a ser removidas del lugar de la sonda.

Cada lugar de prueba es separado de los otros. Con una señal observada en alguna de las posiciones en particular en la serie de sondas se indica que la secuencia problema sea unida a la sonda. Sondas fluorescentes pueden ser unidas a las moléculas de ADN para propósitos de detección. El software lee la posición de la serie por señales fluorescentes e interpreta los datos para determinar la secuencia presente en la muestra de ADN.

Para conocer que alelos STR están presentes en un locus en particular, el chip contiene los alelos conocidos para ese locus. Cada posición de la sonda en el chip tiene diferentes alelos. Los ensayos actuales de hibridaciones de los STR involucran apenas dos sondas que se enlazan y flanquean las regiones de las repeticiones STR. <sup>15</sup>

### **Instrumentos de electroforesis capilar en serie**

Las ventajas de la electroforesis capilar, es su capacidad para automatizar la inyección, separación y detección de la muestra de ADN problema. Sin embargo, una de las mayores desventajas del equipo con un solo capilar es que el número de muestras por tiempo es

limitado ya que es un proceso secuencial. La separación por electroforesis capilar paralelamente puede llevarse a cabo a través de la colocación de un mayor número de capilares creando así un sistema de electroforesis en serie. Cada capilar va a ser análogo a una línea de gel.

En 1999, dos sistemas de electroforesis de 16 capilares en serie fueron comercializados: el ABI 3700 de PE Biosystems (Foster City, CA) y el MegaBACE de Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotechh (Sunnyvale, CA). Estos instrumentos fueron desarrollados para apoyar la necesidad de secuenciar a gran escala debido al proyecto del genoma humano. El equipo ABI 3700 y el MegaBACE tienen 16 capilares en paralelo y tiene la capacidad de secuenciar más de 500 nucleótidos en cada capilar en alrededor de 2 a 3 horas. Estos equipos pueden analizar potencialmente más de 1000 muestras en 24 horas.

Otra de las ventajas del uso de un equipo de electroforesis capilar en serie es que los mismos kits de amplificación de STR pueden ser usados. Los mismos cuatro colores fluorescentes existen comercialmente para estos equipos. Así, los datos de tipificación de STR de los equipos de ECS pueden ser comparados con el ABI 310 en un futuro. <sup>15</sup>

## **Espectroscopia de masas MALDI-TOF**

Otro instrumento capaz de procesar muestras a gran escala es la espectrometría de masas en tiempo de vuelo. La espectrometría de masas es una técnica analítica versátil que involucra la detección de iones y la medición de su proporción de carga / masa. Los iones son separados en un medio de vacío, el tiempo del análisis puede ser extremadamente rápido, al grado de segundos. En combinación con la preparación de muestras automatizada, el tiempo de vuelo de la espectrometría de masas ofrece un gran potencial en el procesamiento de miles de muestras de ADN diariamente.

Debido a la disposición de moléculas de ADN dentro de una fase gaseosa para el análisis en el espectrómetro de masas se puede usar otra técnica conocida como MALDI (matriz-assisted laser desorption-ionization). Cuando MALDI es acoplada con el tiempo de vuelo de la espectrometría de masas, esta técnica de medición comúnmente es referida como MALDI-TOF-MS.

El análisis de ADN usando MALDI-TOF-MS consiste en que una muestra de ADN líquida es combinada con los componentes (en exceso) de una matriz, que contiene ácido picolínico. Esta muestra es colocada en un plato de metal o silicón. Como la muestra se seca al aire, el ADN se cristaliza en la matriz, después el plato con las muestras es introducido en un

medio de vacío en el espectrómetro de masas para su análisis. Entonces un destello producido por el láser inicia el proceso de ionización.

Cada pulsación del láser inicia la ionización de la muestra y la subsiguiente separación de iones en el tubo de vuelo. Los iones de ADN viajan hacia el detector en cuestión de varios cientos de microsegundos ya que ellos se separan con base en su masa. Sin embargo, se necesitan varios segundos para analizar una muestra ya que las múltiples pulsaciones del láser son promediadas para realizar el espectro de masas final. <sup>15</sup>

## El banco de datos genéticos

No existen dos personas con huellas dactilares idénticas y este hecho es de invaluable utilidad en la identificación de delincuentes. De la misma forma, no existen dos personas, a excepción de los gemelos idénticos, que tengan la misma secuencia de pares de bases en su ADN y, por lo tanto, se ha convertido en una potente herramienta para resolver crímenes, casi igual al de las huellas dactilares. El uso del análisis de ADN en apoyo a la investigación del crimen, ha sido el avance más significativo en las ciencias forenses desde la aplicación de las huellas dactilares en el siglo XIX, y ha sido descrito recientemente como “la herramienta de lucha contra el crimen del siglo XXI” por el Servicio de Ciencia Forense (FSS) de Inglaterra y Gales. <sup>12</sup>

El ADN del material biológico obtenido del lugar de los hechos y de probables responsables y la búsqueda de éstos entre una colección de perfiles genéticos en las bases de datos de la policía, se ha convertido rápidamente en una actividad de rutina en la práctica forense en muchas jurisdicciones criminales de todo el mundo.<sup>29</sup> Muchos de los delitos que quedan sin resolver porque en un momento determinado no hay un sospechoso, pueden ser resueltos con posterioridad, incluso años después de que se hayan cometido, gracias al desarrollo de las bases de datos. Las mismas pretenden colaborar en la resolución de casos criminales permitiendo a las fuerzas investigadoras la comparación automatizada de perfiles de ADN provenientes de diversas fuentes: indicios no identificados del lugar de los hechos, muestras de referencias de probables responsables o convictos y muestras de referencia de las víctimas. <sup>12</sup>

Cuando la búsqueda en las bases de datos relaciona a un probable responsable con indicios, se puede ayudar a resolver un crimen. Del mismo modo se puede encontrar que una serie de violaciones de índole sexual se hayan cometido por la misma persona, porque el ADN del esperma coincide en todos los casos, pese a que no se tenga al probable responsable. Antes de la implementación de ampliaciones basadas en el método de PCR en los 90s, la aplicación inicial de la “huella dactilar del ADN” (basada en pruebas mono y multilocus) estuvo confinada primordialmente a resolver asuntos forenses. En esta modalidad de aplicación, los laboratorios comparaban directamente los perfiles genéticos obtenidos del material biológico recuperado del lugar de los hechos con aquellos perfiles de individuos involucrados en un delito en particular bajo investigación. Sin embargo, la subsiguiente capacidad de construir representaciones digitales de perfiles y su almacenamiento en bases de datos computarizadas que permiten la búsqueda continua de información ha hecho posible que el papel del análisis de ADN se amplíe considerablemente en la solución de diversos casos criminales. <sup>12</sup>

Adicionalmente, una gran cantidad de laboratorios cuentan con mejores técnicas de extracción de una gran cantidad de tipos de evidencias que se encuentran en condiciones de escasa cantidad y baja calidad, lo que deriva en la obtención de perfiles genéticos relacionados con un gran número de delitos. Algunas veces, tales métodos pueden ser exitosos cuando otras formas de evidencias forenses han probado ser insuficientes o no confiables en conseguir que los delincuentes sean presentados ante la justicia por delitos cometidos algunos años atrás. Los beneficios de esta tecnología consisten en el potencial de realizar identificaciones rápidas y robustas de probables responsables a través de comparaciones automatizadas en bases de datos criminales centralizadas, la capacidad de eliminar de manera confiable a personas inocentes de las investigaciones, el incremento de la verosimilitud para generar evidencia fiable y persuasiva para presentar al juez, la reducción en el costo de muchas investigaciones, la probabilidad disuasoria de la base de datos de ADN sobre delincuentes potenciales y un posible incremento de la confianza pública en el proceso judicial. Dentro de los aspectos a considerar en la creación de una base de datos de ADN se encuentran:

- a) Tipo de personas consideradas para la inclusión: Probables responsables, procesados, sentenciados.
- b) Tipo de delitos: Robos, homicidios, ataques contra la libertad sexual.
- c) Tiempo de permanencia de los datos en la base: Mientras viva el donante, mientras permanezca en la cárcel, mientras prescriba el delito o hasta que la persona cumpla una edad determinada.
- d) Gestión de la base de datos: Es imprescindible que el acceso al equipo informático sea totalmente restringido, sólo personas autorizadas con claves específicas y en momentos limitados deberían consultar y actualizar las bases, que además debe contar con un historial de movimientos en la misma.
- e) Almacenamiento de indicios y muestras de referencia: Destruirlas o guardarlas terminado el proceso legal.
- f) Datos técnicos y operativos: La calidad y la perfección dependen de múltiples circunstancias que se resumen en disponer de los medios y el personal adecuados.

Existen diferentes bases de datos en el mundo, entre todas estas una de las que más infraestructura tiene es la llamada CODIS (Combined DNA Index System) desarrollado en Estados Unidos por el FBI, el “National DNA Databank”, que almacena la información genética de cualquier sospechoso que es arrestado.

El desarrollo y creación del FBI del denominado Combined DNA Index System (CODIS), o banco nacional estadounidense de perfiles de ADN, supone obtener de la tecnología ADN todo lo que ésta pueda dar de sí:

Los dos objetivos más importantes del CODIS son:

1. Otorgar asistencia a los investigadores en la identificación de sospechosos.
2. Incrementar la eficacia de los laboratorios forenses al facilitarles apoyo para la resolución de casos forenses, incluyendo la realización de cálculos estadísticos.

CODIS es una base de datos jerarquizada que contiene fichas de casos de identificación forense en los que se ha utilizado tecnología ADN. En cada ficha sólo queda registrada la información genética que sirva para una búsqueda en un futuro. <sup>34,37</sup>

En general los datos recogidos por ficha son: a) un identificador del laboratorio; b) un identificador del espécimen; c) las características del ADN, y d) la información que permita clasificar y revisar la integridad del perfil de ADN.

Para ser totalmente operativo, el sistema CODIS del laboratorio del FBI está integrado en una red informática en la que participan laboratorios forenses locales, estatales y federales. De esta manera, CODIS hace posible que todos ellos puedan comparar perfiles de ADN y puedan intercambiar información con el fin de establecer conexiones entre distintos hechos criminales, aunque sean cometidos en distintos lugares y en distinto tiempo, y a veces tratándose de crímenes en serie. En definitiva, permite la identificación de potenciales sospechosos por medio de la comparación del patrón genético de individuos con antecedentes penales con el perfil de ADN de las muestras biológicas recogidas en el lugar de los hechos. <sup>12,27,37</sup>

CODIS se ha incorporado como un banco de datos distribuido en tres niveles, local (Local DNA Index System, LDIS), estatal (Statal DNA Index System, SDIS) y nacional (National DNA Index System, NDIS).

Una gran variedad de estándares se han establecido para garantizar que tan sólo perfiles fiables y compatibles se contengan en los archivos NDIS. Estos incluyen estándares de calidad para la realización de análisis de ADN. Aunque en principio cualquier marcador genético puede ser incluido en LDIS, SDIS y NDIS, se requiere un grupo de loci específico de marcadores para cada perfil de ADN que se quiera introducir en el sistema nacional.

Las recomendaciones de la TWGDAM (Guidelines for a quality assurance program for DNA análisis) son la que se admiten y se siguen para llevar los programas de calidad. <sup>10,21,33</sup>

Cabe mencionar que los derechos humanos, se deben de respetar y en este caso es la privacidad de los individuos, por lo que una eficiente base de datos debe de respetar ciertos lineamientos para preservar estos derechos, cada uno de los estados deben de gestionar las leyes pertinentes para regular este tema.

Las pruebas de ADN sirven no solamente para confirmar una culpabilidad de un delito, si no que también es muy útil para otorgar libertad a personas que pudiesen haber sido condenadas.

Los Bancos de ADN son un ejemplo de la creciente importancia que van adquiriendo la ciencia y la tecnología en las nuevas legislaciones de seguridad. Con todos estos avances no es de esperarse que el perfil genético de una persona se convierta en parte de su identidad formal, como la actual huella digital. Tal vez llegue el momento en que los mecanismos para determinar los patrones del ADN de una persona estén al alcance de cualquiera y que al ser un dato tan inequívoco sea incorporado como un nuevo recurso universal. Sin duda, cada Estado deberá reglamentar el uso de estos datos. Los Bancos de ADN de diferentes Estados y naciones, de seguro, se encontrarán intercomunicados por redes internacionales y los alcances de dicha información dependerán de decisiones políticas. Si bien el objetivo podría ser garantizar la seguridad de la población de un Estado, de una nación o del mundo entero, será fundamental que se respeten las normas éticas básicas de convivencia.<sup>27,34</sup>

El primer caso en que las pruebas de ADN lograron la excarcelación de un convicto sentenciado a muerte en los Estados Unidos fue el de Kirk Bloodsworth, un pescador de la ciudad de Maryland.

En 1984, Bloodsworth había sido condenado a la pena capital por la violación y el asesinato de una niña de nueve años de edad. Su detención ocurrió al poco tiempo de haberse encontrado el cuerpo de la criatura. El hombre rechazó las acusaciones y se declaró inocente, pero, a pesar de que sus abogados trabajaron denodadamente en su defensa, fue detenido y sentenciado. En la cárcel, Kirk entabló una fuerte amistad con otro preso, llamado Kimberley Shay Ruffner.<sup>34</sup>

Finalmente, luego de innumerables apelaciones, los abogados de Kirk lograron que se realizara una prueba de ADN, a través de la cual se podría confirmar o desestimar la culpabilidad de su defendido.

Los resultados determinaron que la huella genética de Kirk era diferente de la del semen hallado en el cuerpo de la niña. En el año 1993, luego de nueve años de prisión, el pescador fue declarado inocente.

La historia cuenta que para Kirk fue muy difícil reincorporarse a la vida de la ciudad. Muchos seguían desconfiando de él y lo consideraban culpable a pesar de todo. Sin embargo, una jueza estaba convencida de su inocencia, por lo que continuaba buscando al responsable de la muerte de la pequeña.

Ya habían pasado otros nueve años desde que Kirk Bloodsworth había salido en libertad cuando nuevas pruebas de ADN demostraron quién era el violador. Como una trampa del destino, la huella genética de su compañero, Kimberley Shay Ruffner, coincidía con la del asesino de la pequeña.

Por ese motivo, en la década del 90, en la ciudad de Nueva York, un grupo de abogados, liderados por Peter Neufeld y Barry Sheck, creó la ONG Proyecto Inocencia. Esta iniciativa tiene como objetivo probar, mediante estudios de ADN, la inocencia de presos injustamente condenados. Los abogados solicitan la revisión de las causas e investigan qué estudios podrían realizarse sobre muestras remanentes que hubieran quedado archivadas.<sup>11,17,25</sup>

Hasta mayo de 2007, el Proyecto Inocencia había logrado la excarcelación de 203 individuos inocente acusados de algún delito. Catorce de ellos habían sido condenados a muerte. Las estadísticas indican que en los Estados Unidos se demuestra la inocencia de una de cada ocho personas condenadas a muerte. Esta ONG ha hecho público también que solamente en el 20 por ciento de las causas penales se dispone de material biológico para realizar pruebas de ADN. Además, cuando consiguen la revisión de las causas y se solicitan nuevos estudios, en el 75 por ciento de los casos las pruebas biológicas han sido destruidas. Los hombres que intentan demostrar su inocencia pasan un promedio de diez años en prisión antes de lograrlo.<sup>11,17,25</sup>

## La Genética forense en México.

Actualmente en México está desarrollándose la Genética forense y la elaboración de bases de datos genéticos. Se cuenta con laboratorios de genética forense con tecnología reciente, dirigidos por la Procuraduría General de la República y algunas procuradurías estatales; también la Policía Federal Preventiva cuenta con laboratorio de Genética forense, así como el SEMEFO (Servicio Médico Forense), además laboratorios particulares de genética, que sirven de apoyo para estas instituciones.

En la Procuraduría de Justicia del Distrito Federal se cuenta con una base de datos de perfiles genéticos, así como en el Estado de México, el cual cuenta con una base de datos más robusta, y en ella guardan perfiles genéticos clasificados en perfiles de delincuentes, perfiles de violadores, o de asesinos seriales, y por último de restos de personas desaparecidas.

Algunos laboratorios particulares que laboran en el país también cuentan con una base de datos, que ocupan para fines de investigación.

Todos estos laboratorios de genética forense se basan en la creación de banco de datos genéticos del CODIS, el cual por su robustez, sirve como base para otras bases de datos, la cual debe de cumplir con ciertos criterios, como son calidad, soporte tecnológico y funcionamiento.

Además existen paginas las cuales tienen bases de datos, para consulta bibliográfica, perfiles de ADN, y cualquier tipo de información de índole Genético.<sup>36,37</sup>

La ex Procuradora General de la República, Maricela Morales Ibáñez en su entrevista en un diario informativo de México, revela que actualmente en la PGR, se tiene ya una base de datos que fue creada conforme a lo acordado en la Conferencia Nacional de Procuración de Justicia, en la que se maneja la información propiamente de las investigaciones federales. Esta es básicamente alimentada por la información enviada por los laboratorios de las fiscalías y procuradurías estatales que cuentan con instalaciones para recoger y analizar muestras de genética forense. En este caso, estamos hablando de 16 estados de la República que son Baja California, Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, México, Distrito Federal, Puebla, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Zacatecas, Querétaro, Aguascalientes y Morelos.

Por otro lado, existen bases de datos de perfiles genéticos, con fines de investigación clínica, como los que se realizan en la UNAM, recientemente se ha conformado un banco de datos con información genética de personas integrantes de pueblos indígenas, la cual ha sido llamada Genoteca Indígena, este proyecto ha recibido 8.1 millones de pesos de

apoyo por parte de Fundación Coca-Cola, con el objetivo de conocer cuál es el “fondo diabetogénico mexicano”.<sup>35</sup>

El proyecto de este banco de datos inició hace diez años, impulsado por la doctora Marta Menjívar Iraheta y su equipo de la Facultad de Química de la UNAM. Los universitarios visitan poblaciones indígenas para obtener muestras de ADN, extraídas de sangre donada voluntariamente por integrantes de estos pueblos.

También existe información de parte del SEMEFO<sup>38</sup> quién describe cómo funciona su laboratorio de genética forense, formado de diversas áreas, separadas en función del proceso o etapa del procedimiento para obtener un perfil genético de una muestra. A continuación se describen estas áreas.

i) Extracción de ADN nuclear

Lugar donde se procesan las muestras biológicas de referencia (sangre y saliva) o muestras forenses (tejido muscular, hueso, manchas de sangre, células espermáticas, tejido en bloques de parafina) para la obtención de un ADN puro.



Fig. 4. Área donde se lleva a cabo la extracción de ADN. <sup>38</sup>

Las moléculas de ADN deben separarse de cualquier otro material celular antes de que éste pueda ser examinado, por consiguiente se han desarrollado métodos de extracción de ADN para poder separar las proteínas y otros materiales de las moléculas de ADN.

ii) Cuantificación de ADN

Sitio donde se valora la calidad de ADN y cantidad de ADN humano obtenido durante el proceso de extracción y purificación del ADN.



Fig. 5. Hardware empleado para manipular los equipos que cuantifican el ADN. 38

Sólo después de que el ADN de una muestra ha sido aislado, la cantidad y calidad podrá determinarse con precisión. La determinación de la cantidad de ADN en una muestra es esencial para la mayoría de los ensayos basados en PCR, ya que concentraciones de ADN relativamente bajas permite que se desarrolle mejor la amplificación de los sitios de interés. La cuantificación del ADN de muestras de referencia (sangre y saliva) se realiza mediante el equipo Nanodrop marca Thermo y para la cuantificación del ADN extraído de muestras forenses como tejido muscular, huesos, tejidos embebidos en parafina, células espermáticas en casos de violación etc., es utilizada una técnica más sensibles como la que se desarrolla en el PCR Tiempo Real marca Applied Biosystems, permitiendo conocer la concentración de ADN humano que se obtuvo posterior al proceso de extracción, es un ensayo que monitorea el producto de PCR mientras tiene lugar la amplificación, analiza ciclo a ciclo los cambios en la señal de fluorescencia generados durante las tres fases de la PCR. 38

iii) Reacción en Cadena de la Polimerasa.

A través de un Termociclador se lleva a cabo la multiplicación exponencial de 15 regiones específicas de ADN no codificante.

Esta técnica permite amplificar más de un millón de veces el ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, utilizando para ello las propiedades de la Taq Polimerasa, siempre y cuando se conozca una parte de la secuencia de los nucleótidos. El rango de tamaño típico para los productos de PCR se encuentra entre 100 y 400 pares de bases.



Fig. 6. Equipo para PCR. 38

iv) Análisis genético automatizado

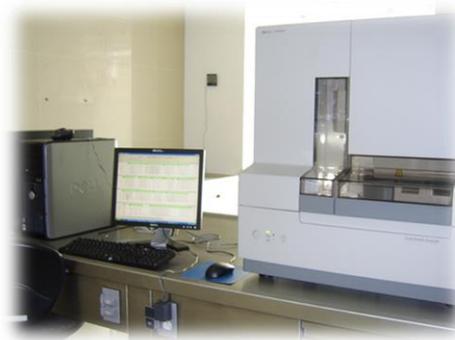


Fig. 8. Analizador genético automatizado. 38

## Discusión.

La información recolectada para el presente trabajo monográfico, muestra una visión general de la Genética forense, sus bases teóricas, así como de su aplicación en las ciencias forenses. Asimismo se explicó la información sobre las bases de datos que existen actualmente, desarrolladas gracias a los avances de la ciencia y de la tecnología.

Con la evolución de las investigaciones científicas, la Genética forense, cada vez tiene más importancia, en la criminalística, ya que se han encontrado mejores técnicas para obtener material genético, así como la forma de poder analizarlo en el laboratorio.

La obtención, cuantificación y análisis del ADN es un método muy eficaz para apoyar a las investigaciones criminales, principalmente para identificar a personas involucradas, o en los casos de desastres para identificar cadáveres, o en pruebas de paternidad, desafortunadamente este tipo de metodologías utilizan equipos y reactivos de muy alto costo, y que también requieren mas tiempo de análisis que otro tipo de indicios o pruebas, es por eso que aun no logra utilizarse como primera opción en países subdesarrollados.

Además es importante resaltar que es difícil obtener de un indicio una muestra que con ADN de alta calidad para su análisis, asimismo la degradación de las muestras también es un factor que provoca no obtener resultados confiables. Pero a pesar de todos estos contras la Genética forense ha logrado ser un método muy útil, no solamente para confirmar una culpabilidad de un delito, sino que también para otorgar libertad a personas que pudiesen haber sido condenadas.

Por otro lado, de acuerdo a las organizaciones de justicia en distintos países como son Estados Unidos, Inglaterra y España, se han desarrollado bases de datos que logran recopilar información para resguardar los perfiles genéticos, que permitirán resolver crímenes a futuro, ya que se contará con datos para comparar y encontrar si es que tienen alguna relación con algún crimen cometido con anterioridad.

Las bases de datos de ADN con fines de investigación criminal son actualmente las de mayor interés para los laboratorios forenses. Por la experiencia acumulada de diferentes países que han desarrollado una legislación específica se sabe que la comparación sistemática de los perfiles de ADN provenientes de distintas causas penales estructurados en una misma base de datos, son de gran ayuda a los órganos de gobierno como posible evidencia que permiten una posible resolución en un caso delictivo.

Todos los países deben de tener regulaciones para poder proteger el tipo de información que se maneja, ya que se está hablando de la identidad de una persona, y existen derechos humanos que protegen este tipo de información, pero así mismo deben de existir leyes que favorezcan al desarrollo de la Genética no solo en el ámbito forense sino también en el ámbito clínico,

## Conclusiones.

- Actualmente las técnicas de Biología molecular son una herramienta fundamental en distintos ámbitos de la sociedad humana, pero principalmente para criminalística es el desarrollo de la Genética forense.
- 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.
- En la actualidad, la identificación en genética forense es una de las pruebas más importante, aunque tiene algunas limitantes como es el manejo de los indicios y el tiempo para analizar el ADN.
- Las bases de datos de ADN con fines de investigación criminal, son en este momento las de mayor interés para los laboratorios forenses. Ya que otorgan asistencia a los investigadores en la identificación de sospechosos e incrementan la eficacia de los laboratorios forenses al facilitarles apoyo para la resolución de casos, incluyendo la realización de cálculos estadísticos.
- Sin duda el desarrollo de la Biología molecular es imparable. Es responsabilidad de quienes trabajan en esta especialidad, y de toda la humanidad, lograr que el alcance de esta tecnología no se utilice en procesos capaces de alterar los principales valores éticos de la humanidad.

## Referencias Bibliográficas.

1. Lincoln P. Forensic DNA profiling protocols 2ª ed. New Jersey: Humana Press; 1984.
2. Matthews Bioquímica. 6ª ed. USA: Adisson Wesley; 2002.
3. ADN estructura y funciones.  
<http://adnestructurayfunciones.wordpress.com/2008/08/15/adn>  
Consultado el 17 de diciembre de 2011.
4. Hipertextos del área de biología. Ácidos nucleicos.  
<http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/adn.htm>  
Consultado el 17 de diciembre de 2011.
5. Ruiz M. Tesina para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. STR,s como marcadores genéticos de identificación forense. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
6. Aula tres. Genética.  
<http://www.aulatres.net/campus/moodledata/6/genetica>  
Consultado el 30 de diciembre de 2011.
7. Lorente M, Acosta JA, Villanueva E. La tecnología del ADN en Medicina Forense: Importancia del indicio y del lugar de los hechos. Cuadernos de Medicina Forense, No. 3, enero 1996.
8. Mullis K. Reacción en cadena de la polimerasa. Investigación y ciencia. 2000:165, 30 – 37.
9. Murray RK. Bioquímica de harper. 3ª ed. Manual Moderno; 1994.
10. Martínez JM. La prueba del ADN en Medicina forense. España: Masson; 1999.
11. Farfán E. Introducción a la tecnología del ADN aplicada en el laboratorio forense. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla. (3934-3956).
12. Lorente JA, Vega ML, Rosas GO. Genética forense, La ciencia al servicio de la justicia. Mensaje Bioquímico. 2007; XXXI: 44-65.
13. Butler J. Forensic DNA Analysis Typing, Biology and Technology behind STR. 2<sup>th</sup> ed. U.S.A: Academic Press; 2003.
14. Pierce B. Genética forense. 3ª ed. España: Ed. medica panamericana; 2009.
15. Lorente JA. Un detective llamado ADN. Ediciones Temas de Hoy. 2004. Madrid.
16. Bernarth V. El ADN como herramienta para la resolución de procesos judiciales. Pasado, presente y futuro. Química Viva. 2008; 2, 7. 103-112.
17. Morales I. y Bernal M. La implementación forense de la tecnología del ADN en Costa Rica: Un análisis retrospectivo. Biol. Trop. 2003.
18. Díaz M. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Avances de la genética forense. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.

19. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. 1985 a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73.
20. Ramírez M. Tesis para obtener el título de Licenciado en derecho. La importancia de la prueba de ADN en la criminalística. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
21. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. 1985 b. Individual specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 316:76-79.
22. Johnson P, Williams R. DNA and Crime Investigation: Scotland and the UK National DNA Database. *Crim. Justice Stud.* 1. UK. 2004.
23. Robertson J. DNA in forensic science. Ellis horwood limited. 1990.
24. Lehninger A.L. Bioquímica. 2ª ed. Omega. 1990.
25. Cubero A, González MJ, Lorente JA. Nuevas aplicaciones en identificación genética. *Cuaderno de Medicina Forense* 2010 Jun: 5-18.
26. Hope R. Structure and function of DNA: an introduction. University of Adelaide. Australia. 2003.
27. Butler JM. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *J Forensic Sci*, March 2006, Vol. 51, No. 2.
28. Hope R. Structure and function of DNA: an introduction. University of Adelaide. Australia. 2003.
29. Word CJ. STR Data goes to court: A laboratory perspective. *Profiles in DNA* 1998; 2(1):7-8.
30. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. 1985. Individual specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 316:76-79.
31. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990.
32. Koblinsky L, Liotti T, Desser J. DNA Forensic and legal applications. USA: Wiley Intersciences; 2005.
33. Mc Pherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR a practical approach. Gran Bretaña: IRL Press. 1994.
34. Jobling M. Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature reviews genetics*. 2004. 739:751-5.
35. México Forense.  
[http://www.mexicoforense.org/?page\\_id=182](http://www.mexicoforense.org/?page_id=182).  
 Consultado 20 diciembre 2012  
 Short Tandem Repeat DNA.
36. Short Tandem Repeat Internet DataBase.  
<http://www.cstl.nist.gov/strbase/>  
 Consultado 20 diciembre 2012.

37. Combined DNA Index System (CODIS), Laboratory Services and databases.  
<http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis>.  
Consultado 12 septiembre 2012.
38. Servicio Médico Forense. Genética Forense.  
<http://www.semefo.gob.mx/swb/SEMFO/Genetica>.  
Consultado 20 diciembre 2012

## Glosario.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN).** Molécula de doble hélice constituida por una espina dorsal de nucleótidos formados a su vez por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina y timina). El ADN es el soporte de toda la información genética que se transmite de generación en generación (genes y regiones no codificantes). Las bases del ADN codifican el ARN mensajero (ARNm), que a su vez codifica las secuencias de aminoácidos. El ADN de una persona es el mismo en cada núcleo de cada una de sus células.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN) polimerasa.** Enzima que interviene en la replicación y la reparación del ADN.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante.** Molécula de ADN formada por componentes procedentes de más de una molécula progenitora; por ejemplo, un inserto de ADN humano colocado en un vector plásmido.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivo.** Secuencias de ADN distribuidas en múltiples copias en el genoma. Pueden aparecer dispersas o repetidas en tándem.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivo disperso.** Variedad de secuencias de ADN repetidas en la que las repeticiones aisladas están extendidas e intercaladas por todo el genoma. Compárese con REPETICIÓN EN TÁNDEM.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN) satélite.** Segmento de ADN cuya composición de bases es lo bastante diferente como para formar una banda distinta en una centrifugación de gradiente de cloruro de cesio; suele contener secuencias de ADN muy repetitivas.

**Ácido nucleico.** Una gran molécula compuesta de subunidades de nucleótidos.

**Ácido ribonucleico (ARN o RNA).** Molécula de un único filamento formada por un azúcar (ribosa), un grupo de fosfato y una serie de bases (adenina, citosina, guanina y uracilo). Existen tres tipos básicos de ARN: mensajero, ribosomal y de transferencia.

**Adenina (A).** Una de las cuatro bases del ADN.

**ADNc.** ADN complementario, formado mediante la transcripción inversa de ARNm purificado a partir de una muestra de células. Este tipo de ADN sólo se corresponde con una secuencia codificadora (exones).

**ADN mitocondrial:** ADN circular que se encuentra en el interior de las mitocondrias, orgánulo celular responsable de la obtención de energía, en un número de copias que oscila entre 1 000-10 000 y cuyo tamaño es de 16 569 pares de bases.

**ADN molde:** ADN del que se pretende obtener múltiples copias de un determinado segmento y que, en una reacción de PCR, la polimerasa usa como referencia para la síntesis de las nuevas cadenas de ADN.

**ADN nuclear:** ADN que se encuentra en el interior del núcleo celular formando parte de los cromosomas y que está presente en todas las células humanas, excepto en los eritrocitos que carecen de núcleo.

**Alelo:** Cada una de las variantes que pueden estar presentes en un locus determinado.

**Antígeno leucocitario humano (HLA).** Término utilizado para designar a los productos proteicos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

**Autosomas:** Cualquier cromosoma diferente a los cromosomas sexuales X y Y. Las células somáticas humanas presentan 22 pares de autosomas (44 en total).

**Cariotipo:** Ordenamiento de la constitución cromosómica de un individuo basado en su número y morfología. En el caso de los humanos es 46 XX en el sexo femenino y 46 XY en el sexo masculino. Cebador o Primer: Fragmento corto de ADN de cadena simple que ligado a la cadena de ADN complementaria permite a la polimerasa extender una nueva cadena de ADN para producir una molécula doble. En una reacción de PCR, se usa un par de cebadores que flanqueen un segmento determinado de ADN para obtener numerosas copias de dicho segmento.

**CODIS:** Siglas de “Combined DNA Index System”. Conjunto estándar de 13 marcadores STR utilizados por los laboratorios de investigación forense en los Estados Unidos de América para obtener el perfil genético de una muestra biológica sometida a un análisis forense.

**Cromatina:** Material del que están compuestos los cromosomas (ADN y proteínas). Cromosoma: Estructura muy compacta que en humanos está constituida por ADN y proteínas. En una célula somática humana existen 46 cromosomas (23 pares) mientras que en los gametos hay 23 cromosomas. Se clasifican en: Sexual: Cada uno de los dos cromosomas (X y Y) cuya combinación determina el sexo del individuo: femenino si la combinación es XX y masculino si es XY. Autosómico: Cada uno de los cromosomas perteneciente a los 22 pares restantes.

**Deleción:** Mutación que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN.

**Desnaturalización:** Separación de las dos cadenas complementarias de una molécula de ADN mediante elevación de la temperatura o exposición a agentes químicos como la formamida o urea.

**Diploide:** Estado en el que una célula posee doble dotación cromosómica, formada por parejas de cromosomas homólogos. Las células somáticas humanas son diploides.

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

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

**Gen:** Segmento de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o de un ARN (ácido ribonucleico). El número total de genes en el genoma humano se estima en unos 30 000.

**Genoma:** Contenido total de ADN en una célula. El genoma humano tiene un tamaño aproximado de 3 000 millones de pares de bases.

**Genotipo:** Combinación alélica en un locus determinado.

Haploide: Estado en el que una célula posee una única dotación cromosómica. Los gametos (óvulo y espermatozoide) son haploides.

**Haplotipo:** Combinación de genotipos de diferentes loci que se heredan en bloque. Se habla de haplotipo cuando nos referimos a regiones de ADN o cromosomas que no están sujetos a recombinación, como el cromosoma Y (de herencia paterna) o el ADN mitocondrial (de herencia materna).

**Heterocigosidad:** Proporción de individuos heterocigotos para un gen o un marcador genético. Este parámetro proporciona una idea de lo polimórfico que puede ser un gen o un marcador genético.

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

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

**Hibridación:** Proceso por el que dos cadenas de ADN complementarias permanecen unidas atendiendo a unas reglas fijas: la A de una cadena siempre se aparea con la T en la

cadena complementaria (mediante dos puentes de hidrógeno) y la C siempre se aparea con la G (mediante tres puentes de hidrógeno).

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

**Huella genética:** Patrón de bandas resultante de un análisis de RFLP y que es característico de cada individuo.

**Locus/Loci (plural).** Posición que ocupa una determinada secuencia de ADN en el cromosoma.

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

**Meiosis:** Proceso de división de una célula diploide por el que, tras dos divisiones consecutivas, resultan cuatro células hijas haploides, es decir, cada una de ellas posee un único miembro de cada par de cromosomas homólogos. Es característico de la gametogénesis.

**Mitocondria:** Organelo celular que contiene en su matriz un tipo de ADN circular que se hereda a través de las mujeres exclusivamente. En análisis forense se emplean marcadores genéticos del ADN mitocondrial para rastrear linajes femeninos.

**Mitosis:** Proceso de división celular cuyo resultado son dos células hijas genéticamente idénticas entre ellas y, a su vez, a la célula madre. Se da en las células somáticas humanas.

**Múltiplex:** Reacción de PCR en la que, mediante la adición de varios pares de cebadores en la mezcla, se amplifican simultáneamente varios fragmentos de ADN.

**Mutación:** Cambio o alteración estructural en el ADN que puede consistir en la sustitución de una base por otra o en la delección, inserción o traslocación de un fragmento de ADN.

**Nucleótido.** Unidad química de la molécula de ADN de cadena simple constituida por un azúcar, un fosfato y una base nitrogenada que puede ser: A (adenina), C (citosina), G (guanina) o T (timina).

**Oligonucleótido.** Pequeño fragmento de ADN de cadena simple compuesto por varias decenas de nucleótidos. Par de bases: Por extensión, se refiere a aquellos dos nucleótidos complementarios (A-T o C-G) que podrían considerarse como la unidad química del ADN de doble cadena.

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

**Perfil genético:** Combinación de los genotipos obtenidos para múltiples loci.

**Polimorfismo.** Variación en el ADN entre individuos de una misma especie. Se dice que un locus es polimórfico cuando la variabilidad afecta a más de un 1% de la población. Existen dos tipos de polimorfismos: De longitud: Los alelos de un locus se diferencian entre ellos por el número total de bases que lo componen. De secuencia: Los alelos de un mismo locus se diferencian en la base (A, C, G o T) presente en una o más posiciones concretas.

**Polimorfismo de un solo nucleótido:** Variación de una sola base en una posición concreta del ADN. En el ADN humano se han descrito más de 2 millones y se ha estimado que ocurren con una frecuencia aproximada de 1 SNP por cada 1 000 nucleótidos.

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

**RFLP** («Restriction Fragment Length Polymorphism»): Tipo de marcador polimórfico de ADN consistente en variaciones en la longitud (nº de nucleótidos) de un segmento de ADN, generado al actuar una enzima de restricción sobre el ADN total de una célula.}

**Secuencia repetida en tándem:** Región de ADN repetitivo constituida por una secuencia determinada que se repite consecutivamente, una detrás de la otra, un número variable de veces. Atendiendo al tamaño de la unidad de repetición, estas secuencias se denominan: Satélite: Unidad de repetición de 1 000-10 000 nucleótidos. Minisatélite: Unidad de repetición de 7-100 nucleótidos. Microsatélite: Unidad de repetición de 2 a 6 nucleótidos.

**Secuenciación:** Determinación del orden de bases en una molécula o fragmento de ADN.

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

**Sonda:** Fragmento de ADN de cadena simple marcado con un isótopo radiactivo o un agente quimioluminiscente, que se utiliza para detectar la presencia de secuencias de ADN complementarias. Puede ser: Unilocus: Reconoce una secuencia específica en un único locus y su hibridación tiene lugar en condiciones muy restrictivas.

**Multilocus:** Reconoce secuencias presentes en diferentes locus y su hibridación tiene lugar en condiciones poco estrictas que requieren menor especificidad en la unión.

**STR** (Short Tandem Repeats): Microsatélite. Tipo de ADN repetitivo. (Repeticiones Cortas en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 2 y 6. En los análisis forenses se utilizan STR's cuya secuencia básica es de 4 nucleótidos.

**Termociclador.** Aparato en el que se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que permite un rápido y preciso calentamiento y enfriamiento de las muestras para que la PCR tenga lugar de forma óptima, así como una gran versatilidad en cuanto a su programación para ajustarse a cada aplicación concreta.

**VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats): Minisatélite. Tipo de ADN repetitivo. (Número Variable de Repeticiones en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 7 y 100. Cada vez menos utilizados en Genética forense.