



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN BIOLOGÍA**

**“La genética forense en la Fiscalía General de la República, obtención de
perfiles genéticos y el ADN mitocondrial “**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

José Eduardo Cruz Hernández

**Matrícula
2143058844**

ASESORES:

Dr. Facundo Rivera Becerril (UAM-Xochimilco)

Dr. Miguel Ángel del Moral Stevenel (Fiscalía General de la República)

Ciudad de México

Noviembre -2019

RESUMEN

La unidad fundamental de un ser vivo es la célula; cada una de las células que lo conforman tiene núcleo, el cual contiene en su interior el ADN necesario para desarrollarse. Según su localización y estructura existen dos tipos de ADN en el organismo, el ADN nuclear, y el ADN mitocondrial, localizado en el interior de las mitocondrias. La genética forense es una especialidad de la genética que incluye un conjunto de conocimientos necesarios para resolver ciertos problemas jurídicos. Los tipos de pericia más solicitados al laboratorio de genética forense son: investigación biológica de paternidad, indicios biológicos (manchas de sangre, espermatozoides, pelos, etc.) y problemas de identificación. El desarrollo de técnicas de biología molecular permite un análisis exhaustivo del ADN contenido en estas muestras, lo que ha logrado que este tipo de evidencias cobre particular importancia, ya que con esto se puede correlacionar la evidencia encontrada en la escena del crimen con un sospechoso. En la Fiscalía General de la República se involucra la generación de resultados científicos y jurídicamente válidos, analizando repeticiones cortas en tándem (STR) y ADN mitocondrial con muestras muy degradadas o con ADN nuclear muy degradado. Se llevó a cabo un seguimiento de las técnicas utilizadas en la Fiscalía General de la República para la obtención de perfiles genéticos utilizando el ADN nuclear. Para el análisis se realizó la reacción en cadena de la polimerasa, que permite utilizar cantidades muy pequeñas de ADN mediante la realización de copias de regiones específicas de la molécula (STR). También se analizó el ADN mitocondrial en un secuenciador masivo de nueva generación. Este análisis es útil únicamente para la identificación de un individuo y encontrar los parentescos mediante los marcadores biológicos haciendo la comparación con los familiares que pertenezcan al mismo linaje materno. 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.

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
2. Marco institucional.....	5
3. Ubicación geográfica.....	5
4. Plan de trabajo.....	5, 6
a. Impacto de las actividades	
5. Objetivos.....	7
a. General	
b. Particular	
6. Antecedentes.....	7
7. Fundamento de las actividades.....	8
a. Habilidades y aprendizajes	
8. Metodología.....	9-14
9. Resultados.....	15-20
10. Conclusión.....	21
11. Referencias bibliográficas.....	22-23

INTRODUCCIÓN

El ADN es una molécula que lleva la información genética que se encuentra en las células de los organismos; su estructura en forma de doble hélice está formada por las bases nitrogenadas adenina, guanina, timina y citosina, además del azúcar desoxirribosa y del grupo fosfato. El ADN puede encontrarse como ADN nuclear, ubicado en el núcleo celular, y como ADN mitocondrial, presente en las mitocondrias.

El ADN mitocondrial y el ADN nuclear son muy útiles; en el momento de extraerlos de las células se puede encontrar una mayor cantidad del ADN mitocondrial porque se conserva por más tiempo que el ADN nuclear (Jumbo, 2016).

El sistema genético mitocondrial presenta una serie de caracteres particulares como son la utilización de un código genético propio con algunas divergencias con respecto al universal, la existencia de una alta velocidad de mutación y su transmisión por herencia materna, no- mendeliana (López et al., 2012).

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 los diferentes tejidos).

Cada ser humano tiene una combinación única e irreversible de este material genético. En un hecho delictivo el responsable dejará siempre un rastro biológico el cual se podrá identificar. Una de estas formas es por medio del análisis del ADN (Lincoln et al., 1998). En la actualidad, la ciencia forense incorpora una amplia gama de disciplinas científicas que trabajan de manera interdisciplinaria para el cumplimiento de los objetivos como asistir el proceso de justicia mediante la evaluación de indicios y así aplicar los conocimientos científicos y tecnológicos.

La investigación criminal tiene una amplia gama de delitos y de evidencias, sin embargo, cualquier procedimiento o, técnica, debe ser aceptado y/o validado por el campo forense antes de su aplicación.

La Fiscalía General de la República (FGR) involucra la generación de resultados científicos y jurídicamente válidos; como parte de los peritos forenses apoya a los operadores de la administración de la justicia en la correcta y debida interpretación de los resultados obtenidos durante la evaluación de los indicios y delimita los alcances de los resultados mediante diversas técnicas.

En cualquier escena del crimen es común encontrar muestras biológicas como saliva, semen, sangre, folículos pilosos y restos de piel; a partir de estas muestras de gran valor se puede obtener ADN de la persona. El desarrollo de técnicas de biología molecular permite el análisis del ADN contenido en estas muestras, y con los datos se puede correlacionar la evidencia con algún sospechoso.

Lo que se pretende hacer con estas pruebas es comparar el ADN recuperado a partir de la evidencia en la escena del crimen con la del sospechoso. Para ello se debe realizar un perfil de ADN, utilizando marcadores genéticos que permitan distinguirlos y/o compararlos.

La genética forense especialmente estudia el polimorfismo o la variabilidad genética de acuerdo con los problemas a investigar:

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.

En México, el desarrollo de la genética forense y de un banco nacional de datos genéticos facilitará la investigación y la resolución de muchos casos relacionados con la identificación humana.

MARCO INSTITUCIONAL

La Fiscalía General de la República tiene como fines la investigación de los delitos y el esclarecimiento de los hechos; otorgar una procuración de justicia eficaz, efectiva, apegada a derecho, que contribuya con el combate de la inseguridad y disminuirla; la prevención del delito; fortalecer el estado de derecho en México; procurar que el culpable no quede impune; así como promover, proteger, respetar y garantizar los derechos de verdad, reparación integral y de no repetición de las víctimas, ofendidos en particular y de la sociedad en general.

A la FGR pertenece la Coordinación General de Servicios Periciales, que se encarga de auxiliar al ministerio público de la federación en la búsqueda, preservación y obtención de indicios y pruebas en investigación y persecuciones de los delitos.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Las actividades del servicio social fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Genética Forense de la Dirección General de Laboratorios Criminalísticos, perteneciente a la Coordinación General de Servicios Periciales, ubicada en Av. Río Consulado 715-721, Santa María Insurgentes, 06430 Ciudad de México.

PLAN DE TRABAJO

Las actividades del servicio social están relacionadas con la obtención de perfiles genéticos. Las muestras biológicas que se utilizaron fueron propias de la Fiscalía, por lo cual los datos de procedencia deben permanecer anónimos.

Cada muestra llevó su debido registro en los formatos requeridos y etiquetados, posteriormente fue procesada.

Los procedimientos por seguir fueron los siguientes: extracción de ADN, cuantificación de ADN, amplificación de marcadores genéticos y detección o tipificación de ADN.

El análisis o prueba de ADN se inició con la extracción del material genético de las células de las diferentes muestras biológicas. Los métodos de extracción de ADN usados fueron de afinidad con kits comerciales (IQ-DNA), que contienen resinas magnéticas para su rápida extracción.

La actual técnica de cuantificación (PCR) se caracteriza por ser un método muy sensible, objetivo y, además, informa de la calidad del ADN extraído.

La amplificación genética está basada en la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR), que consiste en realizar, mediante reacciones químicas a diferentes temperaturas, un número elevado de copias de los fragmentos de interés o “marcadores genéticos”, los cuales únicamente tienen un valor identificativo. Estos fragmentos, de diferente tamaño y marcados con un determinado colorante o fluorocromo, fueron analizados y detectados en los analizadores o secuenciadores mediante un proceso de electroforesis.

Al término del procesamiento de cada muestra, los datos fueron interpretados con gráficos e ingresados y cotejados en la base de datos CODIS, que es un programa informático cedido por el FBI, mismo que permite el cotejo automatizado y sistematizado de perfiles genéticos. Para finalizar, es generado un dictamen con los datos obtenidos.

a. Impacto de las actividades

La criminalística se ocupa principalmente de determinar en qué forma se cometió un delito (crimen) y quién lo cometió (identidad). La aplicación de la ciencia al terreno legal es por tanto la de “reconstrucción” de los hechos acaecidos, y es en este sentido por lo que se añade el adjetivo “forense”. La individualización e identificación humana ha sido siempre un reto en el ámbito criminalístico y forense. Un sistema ideal debe identificar características únicas de cada individuo, que permanezcan en el tiempo y que permitan la comparación de muestras dubitadas de indicios biológicos con muestras de referencia o indubitadas. Los últimos avances científicos han dado un importante impulso a la individualización e identificación humana en el campo forense.

La genética forense tiene un pasado relativamente reciente respecto de otras ciencias forenses; ha tenido una evolución constante y un gran avance en los métodos de ensayo, técnicas y equipos, siendo paralelo a todo ello, el progresivo incremento de la casuística que demanda tales análisis.

OBJETIVOS

a. General

Aplicar las técnicas para obtención de perfiles genéticos de ADN nuclear y ADN mitocondrial.

b. Particulares

Investigar en fuentes de criminalística, acerca de las metodologías en genética forense y su aplicación en México.

Aplicar y valorar la utilidad de la prueba del ADN mitocondrial especialmente en muestras con contenido limitado de ADN en el ámbito forense.

ANTECEDENTES

La descripción de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) hace 60 años, permitió entender el mecanismo de la duplicación del material genético. El Proyecto del Genoma Humano (PGH) se centró en la lectura de cada una de las letras químicas (adenina A, timina T, guanina G y citosina C) que componen las cadenas de ADN. Estos acontecimientos marcaron la historia de la biología moderna y dieron paso al concepto de la expresión de genes (Gonzales et al., 2013).

Desde hace tiempo se está aplicando la prueba de ADN para cualquier investigación forense ya que involucra individuos; el ADN se puede extraer al conocer el origen de la muestra (restos tisulares, huesos, piel, sangre, hasta los fluidos corporales).

En las investigaciones que relacionan el ADN como personas en descomposición, desaparecidos y fallecidos se aplican diversos procesos o métodos científicos para analizar aquellos individuos mediante el reconocimiento del perfil genético de cada uno e investigar la descendencia del individuo (Landsteiner, 1900).

La poliplasmia y la heteroplasmia son las características que diferencian al ADN mitocondrial del ADN nuclear que afectan a las mitocondrias. La cualidad de la poliplasmia es la que representa la presencia de múltiples copias de ADN mitocondrial; en cambio, la heteroplasmia detalla la proporción desigual que sufren los genomas mitocondriales mutados que se muestran en cada célula del individuo (Cataldo et al., 2013).

En el caso del ADN nuclear en los cromosomas, normalmente sólo se estudia la secuencia de pequeñas regiones, denominadas repeticiones cortas en tándem (STR), situadas en los cromosomas sexuales que tendrán un patrón hereditario particular. El estudio del ADN mitocondrial es aplicado en las investigaciones de muestras muy degradadas ya que tiene mayor capacidad de compatibilidad con los familiares más cercanos como madre y abuela.

Este genoma es heredado por la madre a las hijas mujeres. Este ADN no sufre ningún cambio de recombinación genética (González et al., 2013).

FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES

De acuerdo con la definición que sostiene el Colegio Mexicano de Ciencias Forenses, “la genética forense es el análisis de los polimorfismos responsables de la variabilidad genética en la población humana aplicados a los problemas judiciales”. Estos problemas incluyen las investigaciones de paternidad, dadas por una reclamación por parte de uno de los progenitores del menor en cuestión; la criminalística, especializada en asesinatos y delitos sexuales con ayuda de restos orgánicos humanos (sangre, folículos pilosos, saliva, esperma y piel); o bien la identificación de restos cadavéricos, como fue el caso de la familia Romanov, o de personas desaparecidas, como en las narcofosas (Rodríguez et al., 2010).

Para la identificación humana, es importante tener marcadores de ADN que exhiban la más alta variación posible en la población o al menos un número de marcadores polimórficos para que se puedan combinar con el fin de discriminar entre muestras.

El pequeño tamaño de los alelos de STR (100-400 pb) comparado con los alelos microsatélites (400-1000 pb) hace que los marcadores STR sean mejores candidatos para usarlos en el sistema forense en donde es común encontrar muestras con ADN degradado. La amplificación por PCR de muestras con ADN degradado puede realizarse mejor con productos de menor tamaño.

Con el paso del tiempo se ha ido desarrollando la criminalística, definida como la “ciencia aplicada que, de acuerdo con el ordenamiento jurídico de cada país, estudia científicamente los indicios y evidencias con el objetivo de convertirlos en pruebas formales que puedan ser presentadas ante las autoridades judiciales para permitir la identificación de víctimas y de los delincuentes y esclarecer las circunstancias de un probable delito” (Lorente, 2014).

El obtener un perfil es sólo la primera parte del análisis, los perfiles tienen que ser comparados. Si los perfiles son diferentes, la interpretación es simple: la evidencia recolectada del lugar de los hechos no pertenece al probable responsable y se considera como una exclusión. Si los perfiles son los mismos, entonces es una inclusión y significa que la coincidencia debe ser estimada.

a. Habilidades y aprendizajes

Las actividades involucran el aprendizaje, estandarización y aplicación de técnicas de genética forense. Durante la ejecución de esta propuesta de servicio social fue adquirido un adiestramiento metodológico intenso, incluyendo el manejo de muestras biológicas y de material de laboratorio.

METODOLOGIA

ANALISIS DEL ADN NUCLEAR

1) La extracción de ADN para el análisis de STR

Se hizo partir de las manchas café-rojizo de sangre de indicios (ropa, muestras de familiares). Se tomaron dos círculos de 1.2 mm y la extracción se llevó a cabo con el kit DNA IQ SYSTEM™, con una elución final de 50 µl.

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 sinnúmero de sustancias además del ADN. Una molécula de ADN puede ser separada de otros materiales celulares y posteriormente ser examinada. Las proteínas celulares que empaquetan y protegen el ADN en el 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.

Existen diversos procedimientos de extracción, que deben cumplir con la misión de extraer y purificar el ADN, pero la extracción exacta o aislamiento del ADN varía dependiendo del tipo de evidencia biológica o condición de esta al ser examinada.

2) Cuantificación de ADN total y ADNmt

La cuantificación se realizó mediante la técnica de RT-PCR con los reactivos comerciales “Quantifiler™ Trio DNA Quantification” en el equipo de amplificación 9700.

El Quantifiler Trio DNA Quantification Kit permite obtener simultáneamente una evaluación cuantitativa y cualitativa del ADN total humano y humano masculino en una única reacción de PCR en tiempo real altamente sensible. Esto guía la selección de la química óptima del análisis de STR (autosómico, Y-STR o mini STR).

El kit incluye indicadores que ayudan a proporcionar resultados precisos, sensibles y específicos que funcionan junto con el software del equipo Applied Biosystems 7500.

3) Análisis de Repeticiones Cortas en Tandem (STR).

- La amplificación del material genético se realizó por medio de la técnica de PCR Multiplex donde se utilizaron reactivos comerciales de uso forense: “Global Filer™”, “Power Plex® Fusion System” y “Power Plex® Y23 System” e “Investigator® Argus X-12 QS”.

- La genotipificación fue realizada por electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3500 y el programa para análisis de STR GeneMapper ID-X v.1.4, para obtención de datos genéticos forenses.

4) Ingreso, confronta y análisis estadístico en la base de datos.

Se ingresaron los perfiles obtenidos en la base de datos CODIS (tabla de frecuencias de Caucásicos) y el software FAMILIAS (tabla de frecuencias aportada por GITAD).

ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL

El Sistema Ion Chef ofrece preparación automatizada de bibliotecas, preparación de plantillas y carga de chips. El flujo de trabajo del Sistema Ion Chef ahora incorpora todos los pasos de preparación de la biblioteca (amplificación por PCR dirigida con el panel del cebador respectivo, digestión parcial de las secuencias del cebador, ligadura del código de barras/adaptador, purificación, ecualización y agrupación de la biblioteca).

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Preparación de la biblioteca: Donde se almacenan amplicones con secuencias adaptadoras conocidas agregadas a los extremos 5' y 3'; como primer paso se agregan secuencias de cebadores a los amplicones, se preparan para la ligadura y se limpia la secuencia.

- PCR: La PCR en el ciclo térmico amplifica los objetivos utilizando el conjunto de cebadores Ion AmpliSeq. El número de ciclos se basa en el tamaño del Panel, así como en la cantidad de ADN de entrada.

- Digestión cebador: Se acorta el tamaño del amplicón que se va a secuenciar al digerir las secuencias de cebadores conocidos y ayuda en la reparación del extremo, de modo que los extremos sean romos para la ligadura del código de barras.

- Adaptadores de código de barras: Se usan cuando se ejecutan múltiples muestras por secuenciación para identificar cada amplicón.

La secuenciación ocurre típicamente en una superficie debido a que cada secuencia es conocida, los códigos de barras permiten la multiplexación (y la des-multiplexación durante el análisis) y el software reconoce la secuencia y los vuelve a agrupar en la muestra original.

- Ligar códigos de barras a los amplicones: Una vez que se preparan los códigos de barras, cada uno debe ser ligado.

- Limpieza de la biblioteca no amplificada: Elimina los cebadores y adaptadores sobrantes que no están conectados a los amplicones. Para purificar la biblioteca se utilizan perlas de reactivo.

- Amplificación de la biblioteca: Este proceso se produce mediante la adición de ciclos de PCR múltiples. Este paso es opcional, pero Ion Chef lo hace automáticamente.

- Blanco: El ADN se replica para aumentar la señal general. Sin una amplificación eficiente, la detección de cada base es casi imposible.

PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS (ION CHEF)

1. En la primera etapa se realizó la extracción de ADN, se utilizaron muestras de una familia (mujeres) (Tabla 1), mismas que fueron extraídas con autorización y consentimiento.

Tabla 1. Diluciones de las muestras de ADN.

Clave	Concentración de ADN en agua libre de nucleasas	Concentración de ADN en pg/ μ L
4-1291 (Hija)	0.1ng/15 μ L	6.666
5-1290 (Hija 2)	0.1ng/15 μ L	6.666
6-1293 (Mamá)	0.1ng/15 μ L	6.666
7-1292 (Abuela)	0.1ng/15 μ L	6.666
8-1294 (Bisabuela)	0.1ng/15 μ L	6.666

Cada muestra fue colocada por triplicado y se realizó una biblioteca con una duplicación de blancos. En total fueron tres réplicas por chip, con dos chips diferentes, dando un total de seis repeticiones por concentración.

Para el análisis de ADN mitocondrial se utilizaron dos grupos de cebadores, cada uno de ellos hacen lecturas en sentidos diferentes, para así hacer la lectura completa del ADN mitocondrial.

Posteriormente se dispensaron 15 μ L de cada muestra de DNA en los pozos A1 – H1 de la placa IonCode Barcode como se muestra en la figura 1.

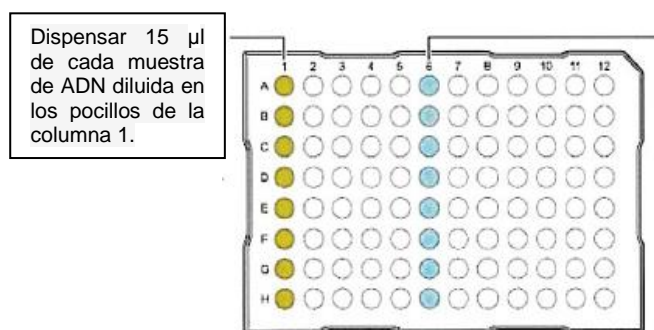


Figura 1. Placa de PCR con la correcta posición de muestras.

2. Después, el Ion Chef™ fue cargado con consumibles y reactivos correctamente
3. Posteriormente se configuró el equipo, ingresando el número de grupos que se añadieron, así como los ciclos de amplificación y el tiempo de alineación/extensión adecuados para la corrida siguiendo las recomendaciones del fabricante (Tabla 2).

Tabla 2. Ciclos de amplificación y tiempo de alineación/extensión que propone el fabricante

Panel	Cantidad de entrada de ADN	Número de pools	Número de ciclos	Tiempo de alineación y extensión
Precisión ID paneles de ADN mitocondrial	0.1 ng de ADN	2	27 ciclos	4



Figura 2. Inicio de la corrida.

4. Posteriormente se inició la corrida (Figura2) que duró aproximadamente 7 h.
5. Al finalizar, las bibliotecas fueron refrigeradas de 4°C a 8°C para su óptima conservación siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuantificación de librería

Para la cuantificación de la librería se preparó una curva con Ion Library TapMan®. Una vez cuantificada, se diluyó la muestra para todos los paneles (Precision ID panels) donde se utilizó 1 ng de gDNA como lo recomienda el fabricante.

La concentración de ADN fue la siguiente:

1 µL es igual a 1.34 pM (producto de la dilución 1:100), pero se necesitaron 50 pM por lo cual se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Fórmula: } C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$(1.34 \cdot 1000)(\text{Volumen } X) = (50 \text{ pM}) \cdot (60 \mu\text{L})$$

$$134 \text{ pM} (X) = 50 \text{ pM} (60 \mu\text{L})$$

$$X = 50 \text{ pM} (60 \mu\text{L}) = 22.4 \mu\text{L}$$

$$134 \text{ pM}$$

Necesitamos 22.4 μL de la biblioteca + 37.6 μL de agua = 50 pM en 60 μL
22.4 + 37.6 = 60 μL (volumen requerido)
50 pM asegura la proporción 1:1, 1 parte de ISP por 1 molécula de biblioteca.

a) Realizar la preparación de la plantilla

Antes de empezar el templado se realizó una plantilla en el servidor de los equipos (SS Torrent Server)

b) Preparación de la corrida en el ION CHEF™ (Templado)

Para realizar el procesamiento de las muestras en el equipo se seleccionó la preparación del blanco que tiene la figura del chip en donde se colocaron finalmente las muestras, y se siguieron los pasos para la colocación de los consumibles y reactivos.

En la figura 3 se observa cómo se colocó la biblioteca.

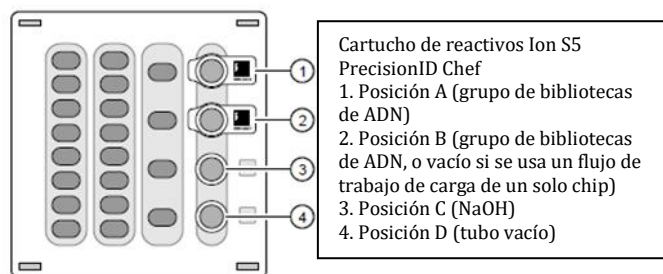


Figura 3. Lugar donde deben ir colocadas las bibliotecas.

Una vez instalados todos los consumibles y reactivos se seleccionó el chip que le corresponde a cada biblioteca y se seleccionó el proyecto que se programó en SS Torrent Server.

Secuenciación

a) Realizar la preparación de la plantilla

Antes de empezar la secuenciación se realizó una plantilla en el servidor (SS Torrent Server) y se seleccionó la lectura del genoma completo (Figura 4).

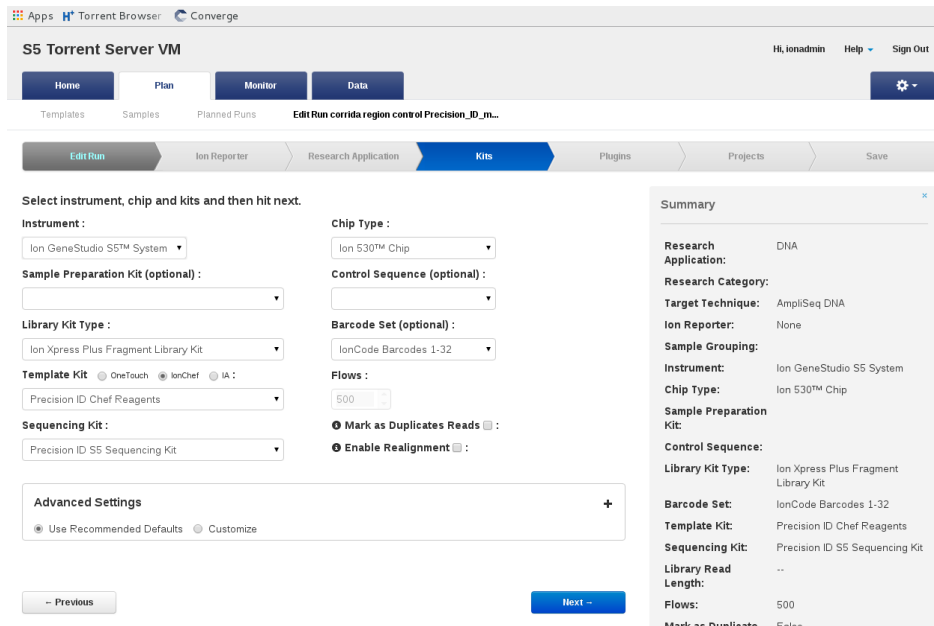


Figura 4. Captura de pantalla de la configuración de la corrida en el servidor (SS Torrent Server).

b) Preparación de la corrida en el ION S5

Para iniciar el proceso de secuenciación, primero se verificó la conexión de los equipos.

Se realizó la instalación de los reactivos y una inicialización con un chip viejo, esto es para quitar todo lo que se quedó en el equipo de desechos.

Posteriormente se cargó el chip que se colocó en el ION Chef con templado y por último se inició la secuenciación.

RESULTADOS

Resultados del análisis del ADN nuclear

Para la obtención del perfil genético (ADN nuclear), se revisaron los datos del secuenciador ABI 3500 en el programa para análisis de repeticiones cortas en tándem (STR) GeneMapper, donde fueron mostradas las siguientes gráficas de los marcadores que lee el equipo (Figura5).

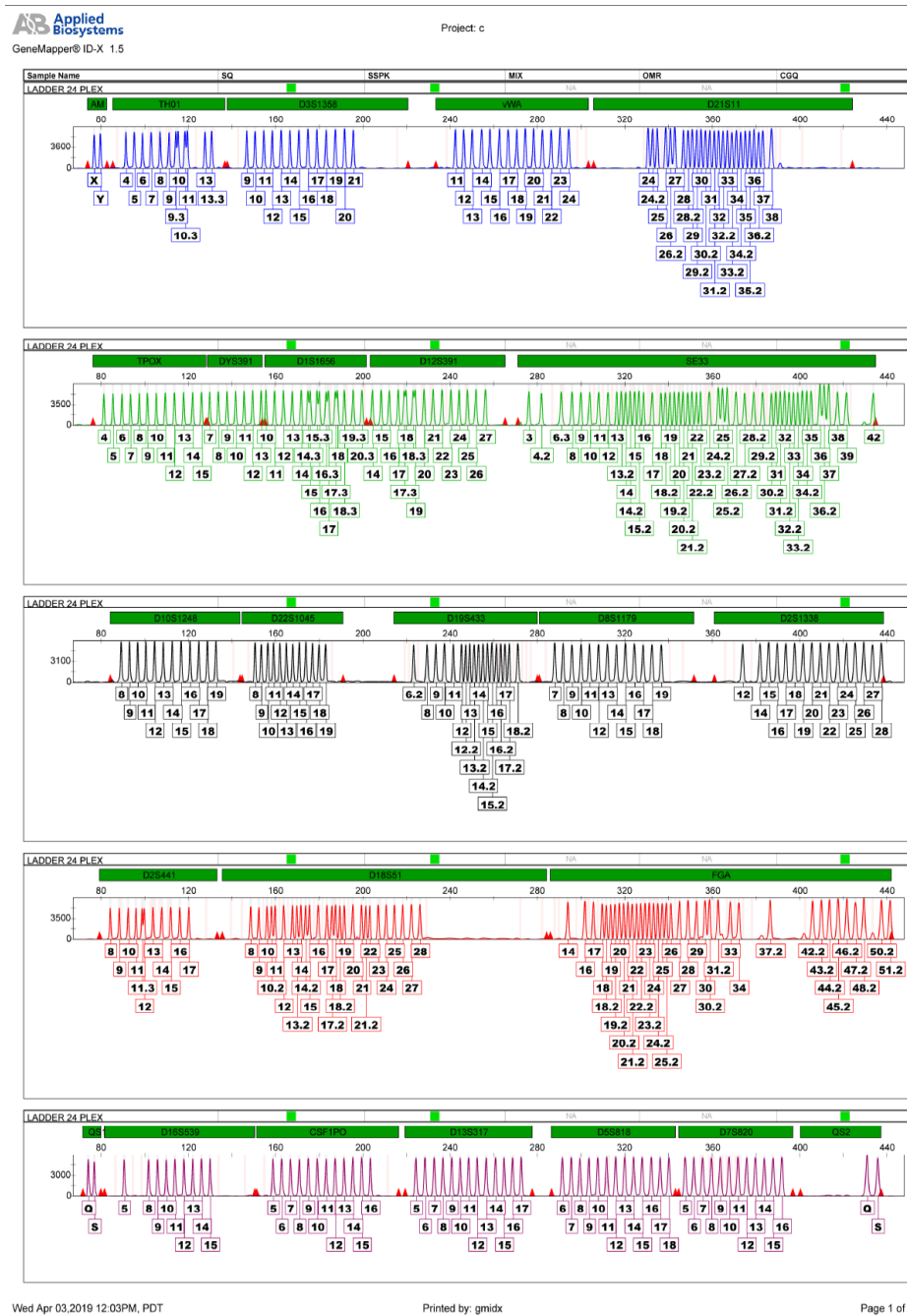


Figura 5. Perfil genético obtenido de GeneMapper.

En el formato de resultados se muestran los marcadores (cuadros color verde) y debajo están las alturas de los alelos que corresponden a esos marcadores.

Para el análisis de alelos STR es importante tener en cuenta los siguientes puntos:

- Las designaciones de alelos STR se hacen comparando el tamaño relativo de picos de muestra a tamaños de alelos de escalera alélicos.
- Los tamaños de alelos STR se basan en una medida de la relativa movilidad electroforética de productos de PCR amplificados, definido por las posiciones del cebador, en comparación con un interno tamaño estándar utilizando un algoritmo de tamaño específico.
- Los alelos STR pueden variar en su longitud total (número de unidades de repetición), con su secuencia interna de repeticiones, y en la región de flanqueo.

Alelos nulos

- Se considera alelo nulo cuando el alelo está presente en la muestra de ADN pero no puede ser amplificado debido a un cambio de nucleótido en un cebador, o sitio de unión.
- El abandono del alelo es un problema porque los heterocigotos en la muestra aparecen erróneamente como homocigoto.
- Algunos cebadores de PCR pueden producir diferentes resultados en muestras procedentes de la misma fuente, causando confusión en las lecturas.

Productos de tartamudeo

- Los productos de tartamudeo son picos que se repiten menos que el alelo verdadero como resultado del deslizamiento de la hebra durante la síntesis de ADN; estos tartamudeos no son tomados en cuenta.

Posterior al análisis de los resultados y su revisión detallada, los perfiles genéticos son ingresados y confrontados en la base de datos del laboratorio CODIS, que es un programa especializado y diseñado para el apoyo de la gestión de bases de datos de ADN, principalmente de criminales identificados por el FBI.

La mayoría de los perfiles de ADN se han generado a través de multiplexados STR utilizando electroforesis capilar (CE).

Sin embargo, algunas muestras de casos no pueden analizarse utilizando STR ya que están demasiado degradadas para proporcionar un perfil con un poder discriminatorio significativo por lo que se lleva a cabo el análisis de ADN mitocondrial.

Resultados de análisis de ADN mitocondrial

Para obtener los resultados de ADN mitocondrial nos dirigimos al ordenador de los equipos y entramos al servidor (SS Torrent Server). Abrimos nuestro Bach nombrado como 1016, donde fueron extraídas las siguientes imágenes que nos brindan datos muy importantes para el análisis del ADN mitocondrial y la posterior validación de los equipos (Figuras 6, 7 y 8).

Variant	Frequency	Status	EMPOP State	Var Strand Bias	Classification	Variant Coverage	Quality Score
73G	99.81	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	17680	1
103A	99.49	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	5245	1
146C	99.88	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	10727	1
153G	99.9	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	10726	1
235G	99.93	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	10639	1
263G	99.74	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	3114	1
309.1C	21.5	Likely	Confirmed	0.75	Length Heteroplasmy	2133	0.68
315.1C	56.24	Possible	Confirmed	0.93	Length Heteroplasmy	5606	0.49
523del	97.71	Confirmed	Confirmed	0.51	True Variant	10298	1
524del	96.84	Confirmed	Confirmed	0.51	True Variant	10194	1
663G	99.84	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	9893	1
750G	98.98	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	3014	1
1438G	99.17	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	1667	1
1736G	99.62	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	7249	1
2706G	99.95	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	7292	1
4248C	99.8	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	1526	1
4769G	99.94	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	4780	1
4824G	99.32	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	5391	1
5773A	98.96	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	2669	1
6935T	99.19	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	8598	1
7028T	99.69	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	2581	1
8027A	99.18	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	10297	1
8794T	99.72	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	2160	1
8860G	97.44	Confirmed	Unchecked	0.51	True Variant	2167	1
9518T	99.32	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	2636	1
11719A	99.74	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	9800	1
12007A	99.42	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	2066	1
12705T	99.64	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	5593	1
14766T	99.85	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	5410	1
15326G	99.88	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	2448	1
16111T	99.71	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	19391	1
16223T	99.69	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	17017	1
16290T	99.42	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	3588	1
16319A	97.84	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	3535	1
16362C	99.69	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	23246	1
73G	99.78	Confirmed	Unchecked	0.5	True Variant	12352	1

Figura 6. Cuadrícula de variantes tomada del CONVERGE con el ION S5. Se observa información de la variante que incluye su frecuencia, el estado de probabilidad (confirmando, probable, posible, incierto y poco probable) estado de EMPOP.

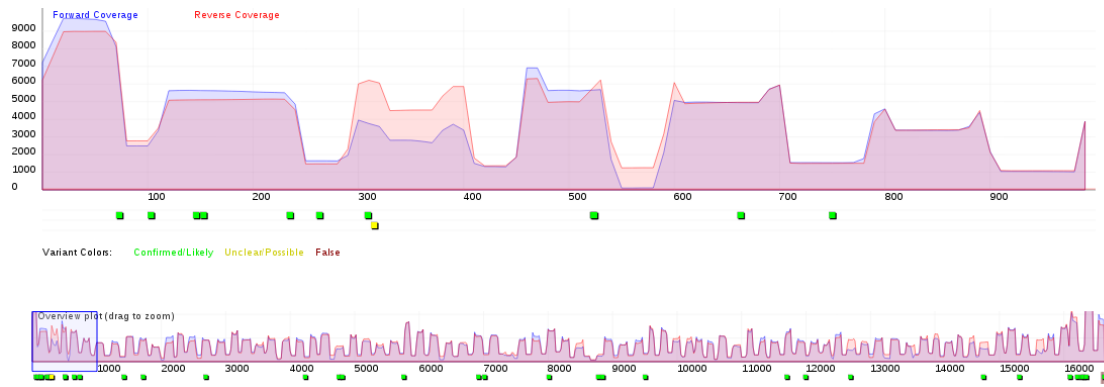


Figura 7. Diagrama de cobertura lineal. La cobertura hacia adelante (azul) y hacia atrás (rojo) se muestra en todo el genoma mitocondrial (panel inferior) con la capacidad de acercarse a las regiones seleccionadas (panel superior).

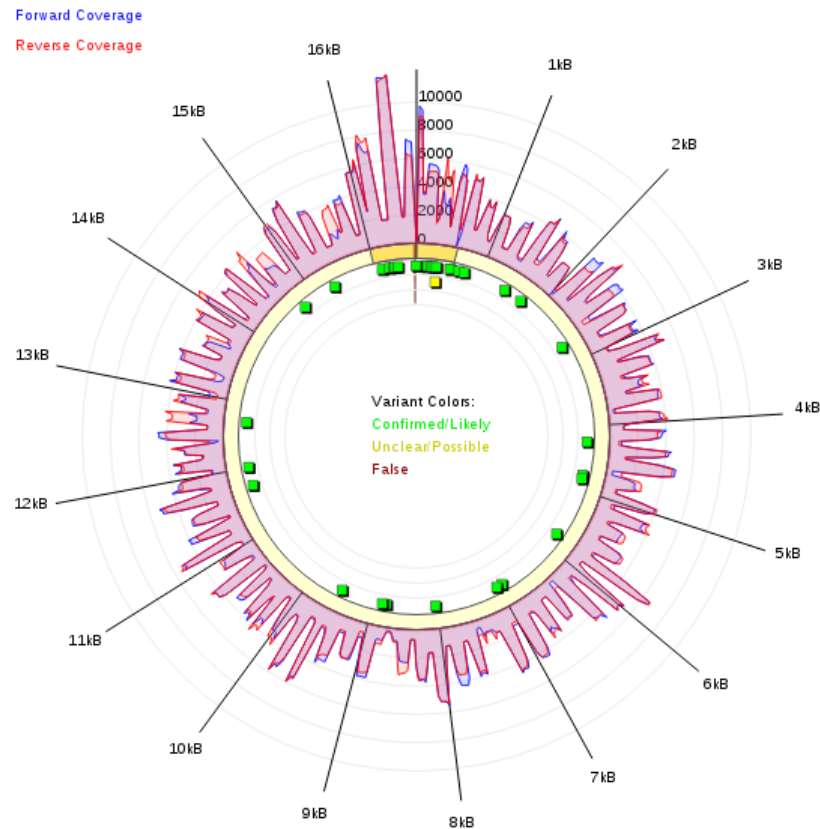


Figura 8. Gráfico circular en Converge Software. Este tipo de gráfico incorpora la visualización del genoma completo del ADN mitocondrial.

Para fines forenses, únicamente se utiliza la región control del ADN mitocondrial, por lo cual se extrajeron datos que corresponden a la región control (HV1, HVII y HVII), para hacer un análisis simplificado como se observa en las siguientes tablas.

HV1 16024 A 16365												HVII 73 A 340																				
Ion S5™ and Ion S5™ XL Instrument Secuenciador de última generación																																
	16111				16223				16290				16319A				16362C				73G			103A			140C			1530		
	16111	16111	16111	16111	16223	16223	16223	16223	16290	16290	16290	16290	16319A	16319A	16319A	16319A	16362C	16362C	16362C	16362C	73G	73G	73G	103A	103A	103A	140C	140C	140C	1530	1530	1530
4-1291	11391	9441	9950	11011	8759	8758	3588	1767	1826	3535	1731	1804	23246	11832	11414	17080	8730	8960	5245	7481	3764	10727	3629	3098	10726	3621	3105					
5-1290	6088	7962	3986	3379	2853	2816	411	713	332	408	216	327	8156	4182	3984	6547	3128	3425	310	450	483	5315	2821	2848	3320	2873	2641					
6-1293	7279	3699	3580	5352	2629	2721	1720	894	826	1681	888	813	3538	3132	2296	7837	3903	3795	3338	1654	1684	4083	2059	2014	4068	2962	2004					
7-1292	9617	5002	4615	6699	3483	3206	1989	1026	963	1955	1909	946	8456	4317	4139	19056	5001	5055	3794	1887	1907	5576	2810	2766	5558	2794	2764					
8-1294	11218	6194	5954	7214	3861	3354	3641	1697	1844	5086	2447	2639	7277	3793	3507	13611	6769	6852	8967	4629	4438	3141	3613	1528	3142	1604	1538					
	HVIII 438 A 574																															
	238G				263G				309.1C				315.1C				73G			523del			524del									
	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control	Mito Control					
4-1291	10639	5500	5139	3114	1647	1467	2133	375	1758	5606	240	5366	12352	6219	6133	10298	5361	4937	10194	5294	4900											
5-1290	5474	2808	2666	573	289	284	970	180	790	2885	246	2639	5618	2670	2948	5965	3123	2842	5938	3111	2827											
6-1293	4044	2017	2027	1989	1049	940	1832	928	904	3190	948	2242	4302	2219	2083	4896	2657	2239	4860	2636	2224											
7-1292	5553	2756	2777	2412	1347	1065	2328	1229	1099	4121	1011	3110	6127	3055	3072	6527	3830	2697	6495	3810	2685											
8-1294	3144	1594	1550	4451	2231	2220	2326	633	1693	3703	459	3244	4571	2188	2383	3479	1722	1757	3458	1710	1748											

Tablas 3 y 4. Resultados correspondientes a la región control de ADN mitocondrial (HV1, HVII y HVII).

Como se observa, todos los marcadores coinciden entre sí, sin ninguna variante. Esto indica que efectivamente todas las muestras corresponden al mismo linaje materno.

En las tablas, para que en una región se consideren los datos comprobados, el porcentaje está en el intervalo 0.9 a 1 de lecturas en ambos sentidos (se indica en verde).

Para que una región se considere probable, el porcentaje está en el intervalo 0.6 a 0.8 de lecturas en ambos sentidos (se indica en azul).

Para que una región se considere poco probable, el porcentaje está en el intervalo 0 a 0.5 de lecturas en ambos sentidos (se indica en blanco).

Esto se dedujo a partir de analizar y revisar la figura 6, en el apartado de frecuencia; esto facilitó el análisis de los datos para así poder comparar todas las muestras de una manera más sencilla.

Una vez revisados los resultados, se comprobó que efectivamente el equipo funciona con precisión, se creó un informe para la Fiscalía, para que posteriormente en la auditoría del laboratorio, pueda ser validada la prueba de ADN mitocondrial, y así poder aplicarla en los indicios muy degradados y obtener resultados confiables para diversos fines.

El ADN mitocondrial no permite la identificación de individuos sino de líneas familiares maternas, lo que en algunos casos supone más una ventaja que un inconveniente, como en la identificación de cadáveres, ya que permite utilizar muestras de familiares no directos que compartan un antecesor común por vía materna con el cadáver a identificar. Por otro lado, el peligro de contaminación de la muestra con ADN exógeno a la misma es grande, debido al alto número de moléculas presentes por célula, por lo que se deben extremar las precauciones en la manipulación de los vestigios biológicos tanto fuera como dentro del laboratorio. Una sola célula del personal que recoge o analiza la muestra es de tanta calidad y contiene tanto ADN mitocondrial que puede interferir en el estudio.

Asimismo, como en cualquier otra técnica criminalística, tampoco debemos olvidar las condiciones en que se encontraba el indicio biológico ya que van a marcar de forma determinante la posibilidad de obtención de resultados óptimos.

GENÉTICA FORENSE EN MÉXICO

En la actualidad México se está desarrollando en genética forense y en la organización de bases de datos. Se cuenta con laboratorios de genética forense con alta tecnología en la Fiscalía General de la República (FGR) y con la Policía Federal Preventiva y el Servicio Médico Forense (SEMEFO). Estos laboratorios de genética forense ingresan sus datos a un banco de datos genéticos (CODIS) el cual debe cumplir con calidad y un excelente soporte tecnológico.

También existen bases de datos de perfiles genéticos con fines de investigación, a cargo de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Esta Universidad tiene un banco de datos de integrantes de pueblos indígenas llamado “Genoteca Indígena”, impulsado por la Facultad de Química, donde los universitarios visitan poblaciones indígenas para obtener muestras de ADN, extraídas de sangre donada voluntariamente.

También la Escuela Nacional de Antropología e Historia (ENAH) cuenta con un laboratorio de genética molecular que está dedicado a la docencia e investigación en el área de la genética antropológica, la cual aplica los métodos y teorías de la genética a temas de interés antropológico. Las investigaciones que ha realizado la ENAH han estado enfocadas en estudiar las poblaciones mexicanas y también abordan las frecuencias de STRs de uso forense para identificación humana.

Actualmente, en México existen 66 laboratorios forenses acreditados y 15 más están en espera de su acreditación (Magallanes, 2019).

En la actualidad se están desarrollando métodos y técnicas de análisis de ADN en todos los procesos: extracción, cuantificación, amplificación de marcadores genéticos y detección o tipificación de ADN, para poder hacer las pruebas más confiables e incluso más rápidas de analizar.

CONCLUSIÓN

El ADN es una herramienta muy aplicada en las investigaciones tanto forenses como criminalísticas. Al estar trabajando con ADN nuclear y ADN mitocondrial me dí cuenta que el ADN mitocondrial es muy útil porque se conserva más que el ADN nuclear, ya que puede contener mil copias por célula y es de herencia materna. Esto permite obtener datos de indicios muy degradados; con ayuda de tecnología de alta gama como es el caso del secuenciador de última generación (ION CHEF) se pueden obtener datos confiables de ADN mitocondrial (linaje materno), en poco tiempo.

En la actualidad, en nuestro país se emplea el ADN nuclear para determinar casos de paternidad y algún parentesco familiar. En la Fiscalía General de la Republica el ADN nuclear es utilizado para resolver casos de violaciones, homicidios y todos los casos que involucren muestras biológicas. Con la existencia de los kits forenses la obtención de perfiles genéticos es más práctica y confiable ya que vienen con marcadores y software de alto desempeño.

Se puede señalar que actualmente a nivel mundial la criminalística ha incorporado sistemas informáticos que le permiten hacer más ágil su labor, por lo que deberemos continuar con planes claros y precisos de modernización, basados en los avances tecnológicos.

Las pruebas de ADN mitocondrial son muy útiles debido a que es una molécula menos compleja que el ADN nuclear, tiene una tasa de mutación más rápida y la herencia es únicamente materna. Además, los cambios en la secuencia del ADN mitocondrial están dados únicamente por mutaciones debido a que no existe recombinación. En el caso de muestras con contenido limitado de ADN es muy útil ya que no se degrada tan rápido como el ADN nuclear y además se cuenta con 16,569 pares de nucleótidos por molécula.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cataldo, L. R.; Olmos, P.; Smalley, S. V.; Díez, A.; Parada, A.; Gejman, R.; Fadic, R.; Santos, J. L. (2013) Heteroplasma de la mutación del ADN mitocondrial m.3243A>G en la diabetes y sordera de herencia materna. *Revista Médica de Chile*, 141(3), 305-312.
- González Oliver, A.; Garfias Morales, E.; Romero García, E.; de la Cruz Laina, M. I.; Acuña Alonzo, A. P.; Pérez Martínez, M.; Sánchez Solís, F.; Corona Comunidad, B. C.; Smith, D. G.; Torre Blanco, A. (2013) Análisis del DNA mitocondrial 14 antiguo y contemporáneo: un acercamiento a las relaciones genéticas en las poblaciones indígenas de Mesoamérica. *Revista Cuicuilco*, 58, 153–171.
- Jumbo Cárdenas, S. E. (2016). Comparación entre el DNA mitocondrial y DNA nuclear en su utilidad en la identificación de personas. Universidad Técnica de Machala, Machala.
- Landsteiner, K. (1900). Zur kenntnis der antifermetativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbe Bakteriol*, 8°, 353-416.
- López Pérez, M.; Ortiz Melón J. (2012). Sistema genético mitocondrial humano. En *Sistema mitocondrial; un reto de la medicina humana*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, 31-43.
- Lorente José, A. (2004). *Un detective llamado ADN*. Ediciones Martínez Roca, 250, España.
- Magallanes, J. (2019). Reconoce EEUU a México como uno de los países más avanzados en ciencia forense. 1, de MVS noticias Sitio web: <https://mvsnoticias.com/noticias/nacionales/reconoce-eeuu-a-mexico-como-uno-de-los-paises-mas-avanzados-en-ciencia-forense/>.
- Lincoln, P. J.; Thomson, J. (1998). *Protocolos de perfilado de ADN forense*. Human Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Rodríguez González, N. (2014). 60 años del ADN. Universidad Nacional Autónoma de México. Sitio web: http://www.dgdc.unam.mx/assets/publicaciones/cuadernos-de-periodismo-cientifico/cpc_01.pdf.

