



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL:

“ANÁLISIS PARA EL ASEGURAMIENTO DE
CALIDAD DE LOS ESTUDIOS DE GENÉTICA
FORENSE MEDIANTE ENSAYOS DE
COMPETENCIA, DESEMPEÑO Y APTITUD”

PASANTE:

MARIANA HERNÁNDEZ ROSALES

LUGAR DE REALIZACIÓN:

FISCALÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA.
COORDINACIÓN GENERAL DE SERVICIOS
PERICIALES
LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE

ASESORES:

DR. ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOZA

ING. CÉSAR ALEJANDRO CUEVAS MELO

Contenido

I.	Introducción	5
II.	Objetivo General	7
III.	Objetivos específicos	7
IV.	Marco teórico	7
V.	Metodología	8
	V.1 Identificación de fluidos corporales	8
	V.1.1 Pruebas presuntivas	9
	V.1.1.1 Prueba de fosfatasa ácido AP	9
	V.1.1.2 Pruebas inmunológicas	9
	V.1.1.2.1 Prueba ABACard HemaTrace	9
	V.1.1.2.2 Prueba ABACard p30	11
	V.1.2 Pruebas confirmativas	12
	V.1.2.1 Tinción de Christmas Tree	12
	V.2 Técnicas que incluyen el análisis de ADN	13
	V.2.1 Extracción de ADN	13
	V.2.1.1 Técnicas para la extracción de ADN	14
	V.2.1.1.1 Extracción orgánica (Fenol-cloroformo)	14

V.2.1.1.2 Tarjetas de papel FTA.....	15
V.2.2 Métodos de extracción de ADN en fase sólida	16
V.2.2.1 Extracción en columnas QIAGEN	17
V.2.2.2 DNA IQ	17
V.2.2.3 Kits PrepFiler Express o PrepFiler Express BTA	18
V.2.3 Separación celular por Differex	19
V.3 Cuantificación de ADN	19
V.4 Amplificación de ADN por PCR de punto final	21
V.4.1 Fundamentos de PCR	22
V.4.2 Componentes y controles de la PCR	24
V.4.2.1 Controles usados para controlar la PCR	25
V.5 Electroforesis Capilar (CE)	26
V.5.1 Separación de ADN	26
V.5.2 Detección de fluorescencia	27
V.5.2.1 Tintes fluorescentes y filtros de emisión	29
V.6 Revisiones técnicas y administrativas	30
V.6.1 Umbral analítico para diferenciar entre señal y ruido	31
V.6.2 Picos ¿Alelos o Artefactos?	32
V.6.2.1 Alelos variantes	33

V.6.2.2	Adición sin plantilla	34
V.6.2.3	Producto stutter	34
V.6.2.4	Alelo nulo o silencioso (alelo drop-out)	36
V.6.3	Alelos heterocigotos, homocigotos o alelos perdidos	38
V.6.3.1	Umbral estocástico	39
VI.	Resultados y discusión	40
VI.1	Resultados de la muestra del hisopo con la mezcla de sangre y Semen	40
V.1.2	Perfiles genéticos obtenidos después de la separación celular y extracción de la muestra del hisopo con la mezcla de sangre y semen	41
VI.2	Resultados de la muestra de sangre en papel FTA	43
VI.3	Resultados de la muestra de polvo de diente	44
VII.	Conclusiones	46
VIII.	Glosario	47
IX.	Bibliografía	49

I. Introducción

La necesidad de mejorar los productos, procesos y servicios ha aumentado con el paso del tiempo, y con ello el término “control de calidad” también ha ido tomando relevancia ya que no solo se limita a asegurar la calidad de los productos terminados con base en sus características cualitativas y/o cuantitativas, sino que su aplicación también se ha ido extendiendo hacia la ejecución de los procesos para asegurar la calidad en cada una de sus etapas y de esta manera evitar errores o defectos tanto en el producto como en los resultados finales. (Hernández, A., 2001)

En cuanto a los laboratorios de ensayo y calibración, el aseguramiento de la calidad es de suma importancia debido a que los equipos, las técnicas y los procedimientos utilizados están en constante evolución, por dicha razón deben ser evaluados por parte de un organismo pertinente que de reconocimiento de la competencia técnica y administrativa del personal del laboratorio para el desarrollo de las pruebas en las cuales se declara apto y de esta manera poder garantizar la confiabilidad de los procedimientos llevados a cabo y de los resultados obtenidos, dicho reconocimiento es a lo que se le denomina “acreditación”. (Hernández, A., 2001).

Un requisito importante para mantener la acreditación de un laboratorio son los ensayos de aptitud los cuales están regidos bajo la norma internacional ISO/IEC 17043:2010 “Evaluación de la conformidad-Requisitos generales para los ensayos de aptitud” y especifica que estos ensayos son utilizados para distintos propósitos, por ejemplo, para evaluar el desempeño de los laboratorios al llevar a cabo ensayos específicos, para hacer un seguimiento continuo de los laboratorios, para establecer la eficacia y la comparabilidad de los métodos de ensayo y para identificar problemas en los laboratorios e iniciar acciones para la mejora que pueden estar relacionadas con procedimientos inadecuados de ensayos, la supervisión del personal o la calibración de los equipos.

Entonces, un laboratorio, ya sea forense o de cualquier otra área de ensayo o calibración, debe contar con un sistema de calidad que cumpla con todos los requisitos necesarios para obtener o mantener una acreditación, no obstante, es importante resaltar que el compromiso de los laboratoristas forenses es aún mayor, porque el sistema de justicia debe tener elementos

científicos y acreditados que le permitan demostrar que los resultados obtenidos son confiables ya que esto es parte del proceso de apoyo a un juez para decidir sobre la culpabilidad o inocencia de un ciudadano, es por ello que el desempeño de los analistas debe ser evaluado mediante los ensayos de competencia, desempeño y aptitud.

En el caso de los laboratorios de genética forense dichos ensayos incluyen las técnicas que son utilizadas en los diferentes delitos, los cuales pueden ser, delitos sexuales, homicidios o para la identificación de personas desaparecidas. Por ejemplo, en el lugar de los hechos, es común encontrar fluidos corporales tales como sangre, semen o saliva, y es necesario identificarlos o bien, confirmar su ausencia, lo cual se lleva cabo mediante pruebas presuntivas o confirmativas más la contribución de los análisis de ADN (Virkler, K., 2009) que incluyen las técnicas de extracción, cuantificación, amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por último la separación y detección mediante electroforesis capilar (CE) de los alelos de repetición en tándem corto (STR). (Butler, J. M., 2011)

Los resultados de los ensayos obtenidos deben ser evaluados mediante la comparación e interpretación de electroferogramas (gráficos que muestran la secuencia de ADN de un perfil genético STR) ya que éstos provienen de muestras conocidas, y de esta manera se asegura la calidad de los resultados porque es una forma de saber si se están logrando las competencias exigidas al personal y el desempeño de los equipos y métodos.

El presente trabajo analiza la importancia de los ensayos de competencia, desempeño y aptitud para asegurar la calidad de los resultados. Asimismo, detalla las técnicas mencionadas anteriormente para tener un mejor entendimiento de ellas, y se explican los aspectos que se incluyen en las revisiones técnicas y administrativas con el propósito de comprender mejor los problemas a los que se enfrentan frecuentemente los laboratoristas forenses al momento analizar e interpretar sus resultados.

II. Objetivo General

Comparar y evaluar la reproducibilidad de los resultados de análisis genéticos de material biológico elaborados por el personal de un laboratorio de genética forense para comprobar la competencia del personal, del laboratorio, y el desempeño de equipos, reactivos y métodos.

III. Objetivos Específicos

Conocer, comprender y aplicar las técnicas utilizadas en material biológico por el personal de un laboratorio de genética forense incluidas en la evaluación de los ensayos de competencia, desempeño y aptitud.

Realizar revisiones técnicas y administrativas de los dictámenes de los ensayos de competencia elaborados por el personal del laboratorio de genética forense, mediante la comparación e interpretación de los resultados obtenidos contra los resultados previamente obtenidos de las mismas muestras control.

IV. Marco Teórico

El objetivo de desarrollar e implementar un sistema de calidad es demostrar el cumplimiento de los requisitos técnicos y administrativos que establecen las normas de calidad. La base de la acreditación de laboratorios se determina, en gran medida, por el desarrollo correcto y confiable de los ensayos realizados. Por ello, es necesario el control adecuado de ciertos factores técnicos para demostrar la competencia de un laboratorio.

El grado de contribución de estos factores en la incertidumbre de las mediciones difiere de una prueba y otra, incluso de un laboratorio a otro. Los factores técnicos más significativos se convierten en requisitos que se deben cumplir. Estos factores pueden ser los siguientes: instalaciones, condiciones ambientales, métodos de prueba y validación, equipos de medición, muestreo, manejo de muestras y humanos. (Hernández, A., 2001).

Por lo tanto, es fundamental que el personal del laboratorio con funciones y responsabilidades directas en el desarrollo adecuado del sistema de calidad, tenga el perfil adecuado para el desarrollo idóneo de su puesto.

De acuerdo con la Norma ISO/IEC 17025, el personal debe ser evaluado mediante las pruebas de desempeño, competencia y aptitud.

En las pruebas de competencia se evalúa el conocimiento, las habilidades, y/o la capacidad de una persona para realizar el trabajo, todo el personal que realiza ensayos debe realizarlas y deben incluir exámenes prácticos que cubran el espectro de las tareas anticipadas relacionadas con el ensayo. Los resultados de la prueba deben ser logrados antes de realizar las tareas en evidencia.

Las pruebas de desempeño como su nombre lo dicen, sirven para monitorear el desempeño del personal. El monitoreo debe asegurar que todo el personal debe completar satisfactoriamente al menos una comparación intralaboratorio, comparación interlaboratorio o ensayo de aptitud por año en cada disciplina en el alcance de la acreditación en el cual el individuo lleva cabo el trabajo.

En el proceso de monitoreo como mínimo se debe asegurar que los resultados no sean conocidos ni estén fácilmente disponibles para el participante, que los métodos sean aprobados, que se conserven registros técnicos apropiados y que se establezcan criterios para determinar la finalización satisfactoria antes de la actividad de monitoreo.

V. Metodología

V.1 Identificación de fluidos corporales

Las muestras biológicas encontradas en el lugar de los hechos juegan un papel fundamental en las investigaciones forenses al proporcionar evidencia valiosa. (Kayser, M. & Knijff, P. 2011)

Además, la determinación del tipo y el origen de las muestras biológicas encontradas en el lugar de los hechos pueden proporcionar pistas importantes para la reconstrucción de la escena del crimen al apoyar un vínculo entre los donantes de muestras y los actos criminales reales. La presencia de ciertos fluidos corporales puede usarse como excelentes indicadores de la secuencia de eventos que ocurrieron. Los fluidos corporales comunes que se encuentran en las escenas del crimen son sangre, semen, saliva, fluido vaginal, orina y sudor. (Hyun, Ja, et al.,2012).

Cada fluido corporal tiene una composición única, y la presencia de componentes específicos en un fluido contra otro es la base de su identificación. (Virkler, K., 2009)

V.1.1 Pruebas presuntivas

Las pruebas presuntivas se utilizan inicialmente para dar alguna indicación sobre la identidad de la sustancia. (Virkler, K., 2009)

V.1.1.1 Prueba de fosfatasa ácida (AP)

La prueba de fosfatasa ácida (AP) es una de las pruebas más comunes para la detección de semen. La AP es una enzima secretada por la glándula prostática que está presente en grandes cantidades en el líquido seminal. La AP puede catalizar la hidrólisis de fosfatos, lo que resulta en la formación de un producto que reaccionará con el revelador de color. Por lo tanto, en presencia de fosfato de ácido alfa-naftil y Brentamine Fast Blue, AP producirá un color púrpura oscuro. Sin embargo, la prueba de AP es altamente presuntiva porque las secreciones vaginales y otros fluidos corporales también contienen niveles detectables de esta enzima. (Virkler, K., 2009)

V.1.1.2 Pruebas inmunológicas

V.1.1.2.1 Prueba ABACard® HemaTrace®

ABACard® HemaTrace®, es una prueba inmunocromatográfica para la detección de sangre humana. La hemoglobina humana se une al conjugado de colorante de anticuerpo móvil y comienza a difundirse a lo largo de la membrana de prueba como un complejo antígeno-anticuerpo móvil (**Figura 1.1.2a - Filas 1 y 2**). A medida que este complejo pasa al área de

prueba "T", se une a un anticuerpo policlonal anti-hemoglobina humana inhumana (**Figura 1.1.2a - Fila 3**). Además, a lo largo de la membrana, existe un área de control "C", que contiene anticuerpo anti-inmunoglobulina (Ig) inmóvil. En esta área, los conjugados de colorante de anticuerpo de hemoglobina antihumano monoclonal no unidos se unirán (**Figura 1.1.2a - Fila 3**) y sirven como control positivo para la prueba. (Johnston S., Newman J. & Frappier R., 2003).

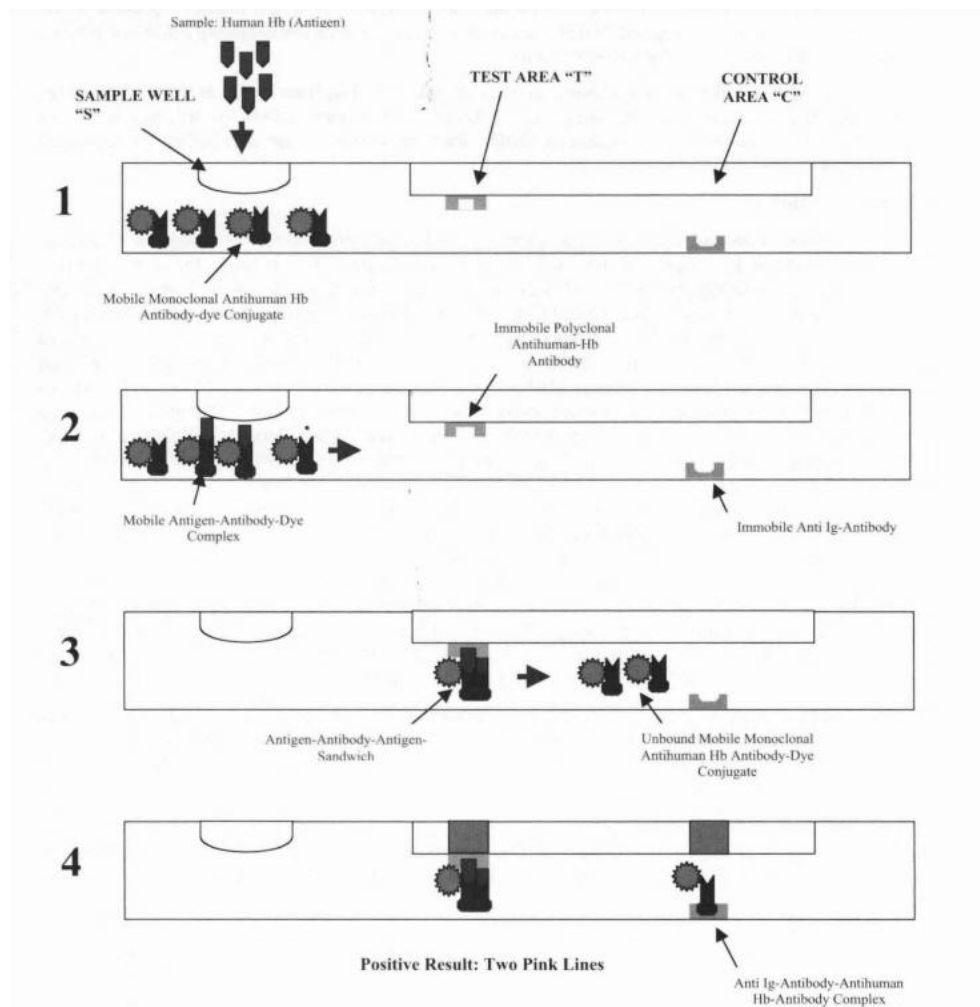


Figura 1.1.2a El complejo móvil de Hb-anticuerpo-colorante humano se une al anticuerpo policlonal inmóvil en la zona de prueba "T". El complejo anticuerpo-colorante no unido se une al anticuerpo inmóvil anti-Ig en el área de control "C". Esto da como resultado la formación de dos bandas rosadas que indican un resultado positivo. (Figura tomada de: Johnston S., Newman J. & Frappier R., 2003).

En el caso de una prueba positiva para hemoglobina humana, habrá dos bandas. Una aparece en el área de prueba, y consiste en un sándwich de antígeno-anticuerpo-antígeno acumulado, y el segundo aparece en el área de control, como resultado de la acumulación del exceso de complejos de anticuerpos anti-Ig-anticuerpo anti-hemoglobina humana (**Figura**

1.1.2b). En el caso de la ABACard® HemaTrace®, el tinte utilizado es rosado en color, por lo que las bandas aparecen como líneas de color rosa sólido en las áreas de prueba y control de la membrana. En una situación en la que no hay hemoglobina humana presente, no habrá acumulación en la línea de prueba, y solo una banda, en la línea de control, será visible. (Johnston S., Newman J. & Frappier R., 2003).

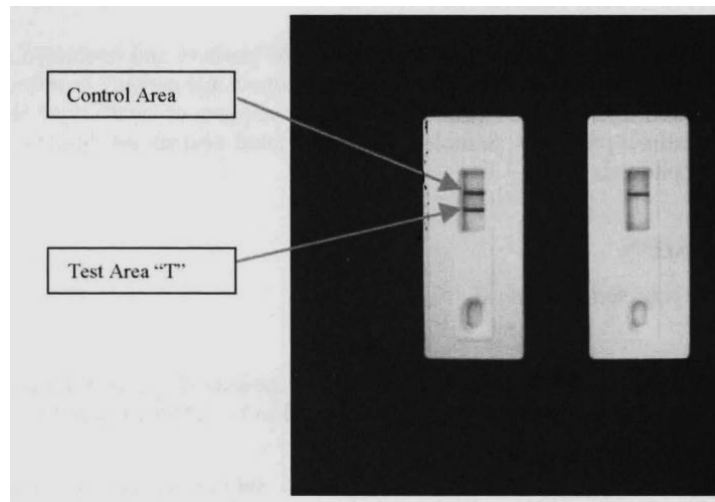


Figura 1.1.2b Un resultado positivo (izquierda), negativo (derecha) en el ABACard® HemaTrace®. (figura tomada y modificada de: Johnston S., Newman J. & Frappier R., 2003).

V.1.1.2.2 ABACard® p30

La prueba ABACard p30 está diseñada para detectar cualitativamente el marcador p30 en la identificación forense de semen. p30 es un marcador aceptado para detectar semen en casos criminales que incluyen individuos vasectomizados o azoospermicos.

En este procedimiento la muestra se añade al pocillo de muestra "S", y se deja a remojar. Si p30 está presente en la muestra de semen, reaccionará con el anticuerpo monoclonal móvil antihumano p30 y un complejo de anticuerpo de antígeno móvil se formará. Este complejo móvil antígeno-anticuerpo migra a través del dispositivo absorbente hacia el área de prueba "T". En el área de prueba "T", se inmoviliza un anticuerpo monoclonal antihumano p30. Este anticuerpo inmovilizado captura el complejo anterior para que se forme un sándwich

anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Las partículas de colorante rosa conjugado se concentran en una zona estrecha en la membrana. Cuando la concentración de p30 en la muestra excede de 4 ng / ml, las partículas de colorante rosa formarán una banda de color rosa en el área de prueba T que indica un resultado positivo de la prueba. Como control positivo interno, los conjugados de tinte de anticuerpo p30 no pueden unirse al anticuerpo en el área de prueba T, pero son capturados por un anticuerpo anti inmunoglobulina inmovilizado presente en el área de control C formando un complejo. Las partículas de tinte rosa capturadas formarán una banda en el área de control C, lo que indica que la prueba ha funcionado correctamente, por lo tanto, la presencia de dos líneas coloreadas, una en el área de prueba T y otra en el área de control C, indica un resultado positivo, mientras que una línea solo en el área de control C indicaría un resultado negativo (ver **Figura 1.1.2.2**)

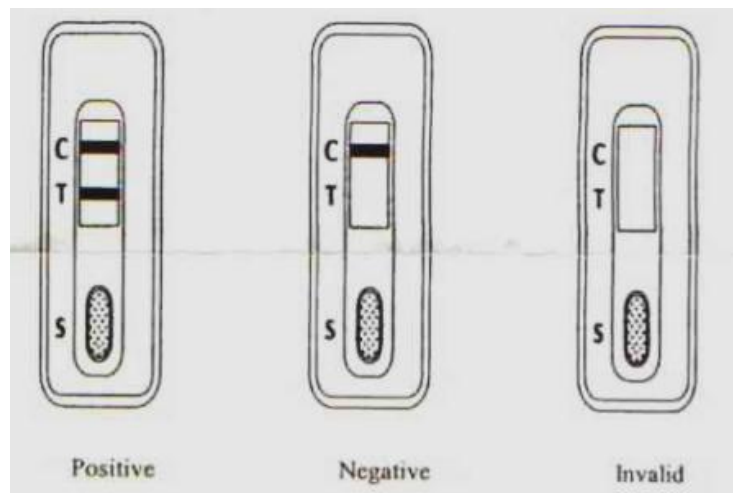


Figura 1.1.2.2 Un resultado positivo (izquierda), negativo (centro) y un resultado inválido (derecha) en el ABACard® p30 (figura tomada de: ABACard® p30 Test for the forensic Identification of semen).

V.1.2 Pruebas confirmativas

Las pruebas confirmatorias se utilizan para identificar de manera concluyente la presencia de ciertos fluidos corporales, como la identificación microscópica de espermatozoides. (Virkler, K., 2009)

V.1.2.1 Tinción Christmas Tree

La técnica confirmatoria más confiable y ampliamente aceptada para la detección de semen es la identificación microscópica de espermatozoides. El semen es el único fluido

corporal que posee células de esperma, y la gran cantidad de ADN en las cabezas se puede tratar con una tinción para que el esperma sea visible. La técnica más utilizada es la Tinción Christmas Tree, y es conocida por sus colores característicos que tiñen las cabezas de rojo y las colas de verde. (Virkler, K., 2009)

V.2 Técnicas que incluyen el análisis de ADN

V.2.1 Extracción de ADN

Las muestras biológicas que se trabajan en un laboratorio de genética forense, a menudo provienen de manchas de sangre, semen o incluso muestras de tejido de un individuo conocido como sangre o un hisopo bucal, el problema con estas muestras radica en que no solo contienen moléculas de ADN sino que también incluyen otras sustancias como proteínas y materiales celulares, los cuales dificultan su análisis, por esta razón se han tenido que desarrollar métodos de extracción que separen las moléculas de ADN de otras sustancias celulares.

El proceso de extracción tiene como objetivos; lisis de las células para liberar las moléculas de ADN, separar las moléculas de ADN de otros materiales celulares, y aislar el ADN en un formato compatible con aplicaciones posteriores, incluida la amplificación por PCR. (Butler, J. M., 2011)

Durante el proceso de extracción es importante tratar de evitar una mayor degradación de la plantilla de ADN, así como eliminar los inhibidores de la PCR cuando sea posible. La presencia de inhibidores o ADN degradado puede conducir a una falla completa de amplificación por PCR o una sensibilidad reducida de detección, generalmente para los productos de PCR más grandes. Una vez extraído el ADN es almacenado a -20°C o incluso a -80°C cuando se almacena por un largo periodo para prevenir la actividad nucleasa. Las nucleasas son que degradan ADN para permitir que las células reciclen los componentes de nucleótidos. (Butler, J. M., 2011)

V.2.1.1 Técnicas utilizadas para la extracción de ADN

Existen diferentes técnicas para la extracción de ADN y su uso varía según el tipo de evidencia biológica que se examina, ya que la sangre completa debe tratarse de manera diferente a una mancha de sangre o un fragmento de hueso. (Stray, J. E., et al., 2010).

V.2.1.1.1 Extracción orgánica (Fenol-Cloroformo)

La extracción orgánica implica la adición de varios productos químicos. Primero son agregados el dodecil sulfato de sodio (SDS) y la proteinasa K para abrir las membranas celulares y descomponer las proteínas que protegen las moléculas de ADN mientras están en los cromosomas. En seguida, se agrega una mezcla de fenol-cloroformo (mezcla orgánica-acuosa) para separar las proteínas del ADN, lo cual se logra porque el ADN es más soluble en la porción acuosa, por lo tanto, cuando se centrifugan, las proteínas no deseadas y los restos celulares se separan de la fase acuosa y las moléculas de ADN de doble cadena se pueden transferir limpiamente para su análisis. (**Figura 2.1.1.1**) (Butler, J. M., 2011)

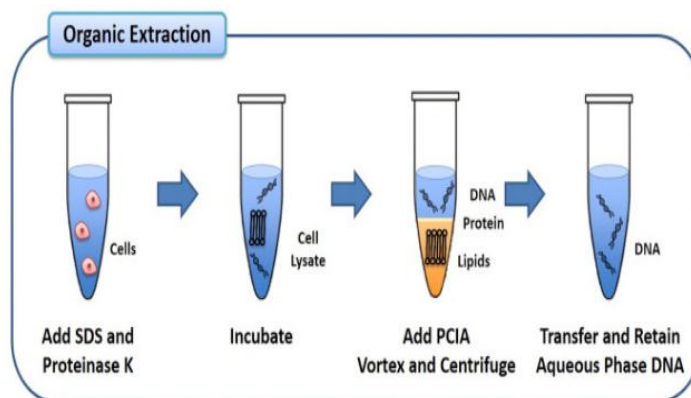


Figura 2.1.1.1. Extracción orgánica fenol-cloroformo. (PCIA, fenol, cloroformo, isoamil alcohol; SDS dodecil sulfato de sodio) (Figura tomada de: McKiernan H. & Danielson, P., 2017)

Si bien este método sigue siendo uno de los más confiables y eficientes, también consume mucho tiempo, utiliza productos químicos peligrosos y, debido al mayor esfuerzo

práctico y a las múltiples transferencias de tubos involucradas, presenta mayores riesgos de contaminación y mal manejo de muestras. (McKiernan H. & Danielson, P., 2017)

V.2.1.1.2 Tarjetas de papel FTA

Otro enfoque para la extracción de ADN implica el uso de papel FTA como un método para el almacenamiento de ADN. El papel FTA es un absorbente basado en celulosa que contiene 4 sustancias químicas que protegen las moléculas de ADN de la degradación de nucleasas y preserva el papel del crecimiento bacteriano, como consecuencia se puede almacenar por un largo periodo a temperatura ambiente. (Butler, J. M., 2011)

Dado que el ADN permanece unido al papel, las manipulaciones para purificar el ADN se simplifican y se pueden automatizar. Las muestras de ADN en tarjetas FTA ofrecen un sistema de almacenamiento muy compacto en comparación con viales de vidrio o tubos de plástico en congeladores. También se ha demostrado que la tecnología FTA tiene límites de detección en PCR prácticamente idénticos a los que usan ADN extraído tradicionalmente (Alhassan et al., 2007).

El uso de papel FTA simplemente implica agregar una mancha de sangre al papel y permitir que la mancha se seque. Las células se lisan al contacto con el papel y el ADN de los glóbulos blancos se inmoviliza dentro de la matriz del papel. Se saca un pequeño trozo de papel de la mancha de sangre de la tarjeta FTA y se coloca en un tubo para lavar. El ADN unido puede purificarse lavándose con el reactivo de purificación FTA (Whatman, Clifton, NJ) para eliminar el hemo y otros inhibidores de la reacción de PCR. (**Figura 2.1.1.2**) (Butler, J. M., 2011)

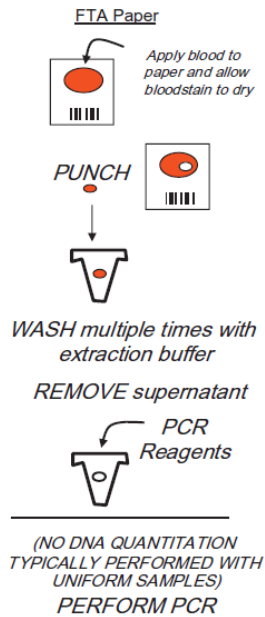


Figura 2.1.1.2. Extracción de ADN utilizando papel FTA. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

V.2.2 Métodos de extracción de ADN en fase sólida

Las extracciones en fase sólida se han desarrollado con la finalidad de automatizar los pasos en el análisis y obtener un alto rendimiento de ADN. En este tipo de extracciones el ADN se une selectivamente a un sustrato (como partículas de sílice). El ADN se retiene mientras las proteínas y otros componentes celulares se eliminan y finalmente el ADN se libera en forma purificada. Los métodos de extracción en fase sólida más utilizados son las columnas QIAGEN, DNA IQ y PrepFiler. (**Figura 2.2**) (Butler, J. M., 2011)

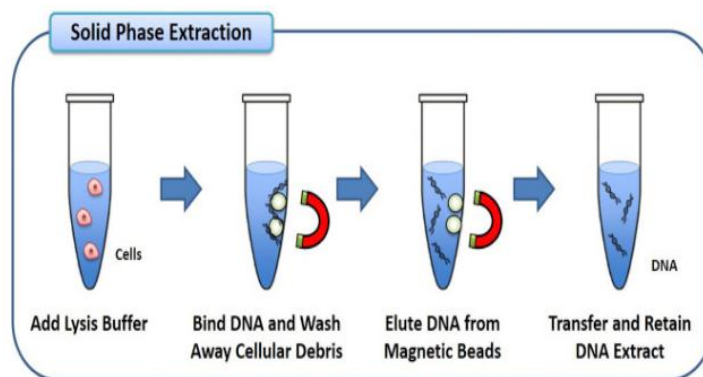


Figura 2.2 Extracción en fase sólida. (Figura tomada de: McKiernan H. & Danielson, P., 2017)

V.2.2.1 Extracción en columnas QIAGEN

Los ácidos nucleicos se absorben selectivamente a la sílice en un soporte en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas como clorhidrato de guanidina, isotiocianato de guanidina, yoduro de sodio y perclorato de sodio. Estas sales caotrópicas interrumpen las redes de enlace de hidrógeno en el agua líquida y, por lo tanto, hacen que las proteínas desnaturalizadas y los ácidos nucleicos sean más termodinámicamente estables que sus contrapartes plegadas o estructuradas nativas (Tereba et al., 2004).

Si la solución es más ácida que pH 7,5, la adsorción de ADN a la sílice generalmente es de alrededor del 95% y las impurezas no deseadas pueden eliminarse por lavado. En condiciones alcalinas y bajas concentraciones de sal, el ADN se eluirá eficientemente del material de sílice. (Butler, J. M., 2011)

V.2.2.2 DNA IQ

Utiliza las mismas reacciones químicas de unión y elución de ADN a base de sílice que los kits QIAGEN, pero con resina paramagnética recubierta de sílice (Tereba et al. 2004). Con este enfoque, el aislamiento de ADN se puede realizar en un solo tubo simplemente agregando y eliminando soluciones.

Primero, las moléculas de ADN reversiblemente unidas a las perlas magnéticas en solución con un pH más ácido que 7.5. Se usa un imán para atraer las perlas magnéticas recubiertas de sílice hacia el fondo o el costado del tubo, dejando cualquier impureza en la solución. Estas impurezas de la solución (proteínas, restos celulares, etc.) se eliminan fácilmente extrayendo el líquido de las perlas. (Butler, J. M., 2011)

V.2.2.3 Kits de extracción de ADN forense PrepFiler® Express o PrepFiler® Express BTA

Ambos kits de extracción de ADN forense PrepFiler® o PrepFiler® BTA usan perlas magnéticas recubiertas de polímero en presencia de una sal caotrópica para unir el ADN y separarlo de otros materiales en solución. (Ferguson, E., 2014).

El kit de extracción forense BTA de PrepFiler® se usa específicamente para extraer ADN de muestras difíciles, como huesos, dientes y tipos de muestras forenses adhesivas (goma de mascar, colillas de cigarrillos, muestras de cinta elevadora). Cuando se usan muestras de hueso, el polvo de hueso se incuba inicialmente durante dos horas con la solución de lisis, que consiste en el tampón de lisis con ditionitrotol (DTT) y proteinasa K. Estos reactivos lisan las células, quelan los iones de la solución y digieren las proteínas. Después de la lisis, la muestra se centrifuga y el sobrenadante que contiene el ADN se transfiere a un tubo de muestra. (Ferguson, E., 2014).

La química de PrepFiler® primero une el ADN a través de la presencia de la sal caotrópica formando un puente de sal entre el ADN cargado negativamente y el cordón magnético recubierto de polímero. La unión máxima del ADN se produce en condiciones de alta sal y bajo pH, lo que permite que se formen puentes de sal entre el ADN y la partícula. Después de la unión a las perlas, se usan tampones de lavado para eliminar las proteínas degradadas y otros inhibidores. Los tampones de lavado no interrumpen el puente de sal entre el ADN y la partícula, permitiendo que el ADN permanezca unido durante los pasos de lavado. Luego se eluye el ADN usando el tampón de elución. Mientras que el ADN se une a la columna en condiciones de alta sal, el ADN puede eluirse usando tampones con baja concentración de sal. (Ferguson, E., 2014).

V.2.3. Separación celular por Differex

La separación celular por Differex es una versión modificada del método de extracción orgánica que separa las células epiteliales de las células espermáticas. Es comúnmente utilizada

por los laboratorios forenses en casos de agresión sexual donde se tiene una mezcla de ADN masculino y femenino, ya que, al separar la fracción masculina del perfil de ADN de la víctima, es mucho más fácil interpretar el perfil de ADN del acusado en un caso de violación. (Butler, J. M., 2011)

Este método aprovecha las diferencias en la composición de la membrana celular entre las células espermáticas y las células epiteliales para separarlas. (Lounsbury, J. A, et al., 2014) Implica romper las células epiteliales femeninas con incubación en una mezcla SDS/ proteínasa K. Los núcleos de espermatozoos se lisan posteriormente mediante tratamiento con una mezcla de SDS/proteínasa K/ditiotreitol (DTT). La DTT descompone los puentes disulfuro de proteínas que forman las membranas nucleares de los espermatozoos. La extracción diferencial funciona porque los núcleos de espermatozoos son impermeables a la digestión sin DTT. (**Figura 2.3**) (Butler, J. M., 2011)

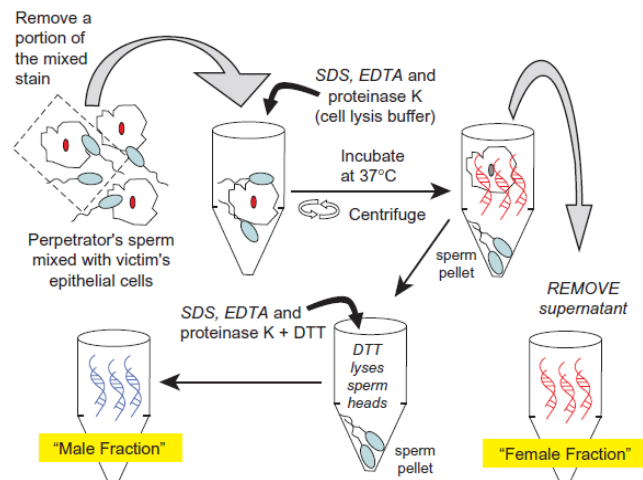


Figura 2.3. Separación celular por Differex (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

V.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN extraído de muestras biológicas de casos forenses es un paso importante ya que puede tener presente tanto el ADN humano de interés como ADN no humano (por ejemplo, material bacteriano, fúngico, vegetal o animal). Por lo tanto, el objetivo principal de la cuantificación es determinar la cantidad apropiada de plantilla de ADN humano para la

amplificación por PCR de loci de repetición en tándem cortos (STR) y evitar datos fuera de escala o artefactos asociados.

La determinación de la cantidad de ADN en una muestra es esencial para la mayoría de los ensayos basados en PCR porque un rango de concentración estrecho funciona mejor con la tipificación multiplex de repetición en tándem corto (STR) (0.5 ng a 2.0 ng de ADN humano es óptimo). La amplificación por PCR de demasiado ADN da como resultado electroferogramas exagerados que hacen que la interpretación de los resultados sea más difícil y lenta de revisar, por el contrario, muy poco ADN puede provocar la pérdida de alelos debido a la amplificación estocástica y la incapacidad de muestrear por igual los alelos STR presentes en la muestra. **(Figura 3)** (Butler, J.M., 2011)

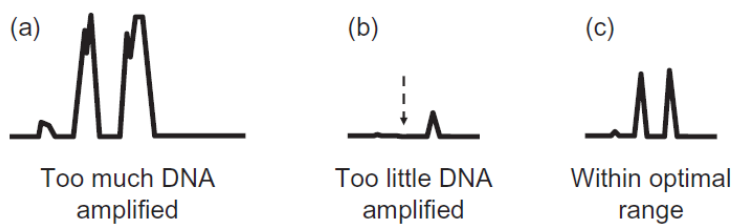


Figura 3. Ilustración de los resultados de la tipificación de STR en un solo locus heterocigoto para una muestra de fuente única con (a) demasiado ADN que muestra la escala, picos divididos, (b) muy poco

ADN donde la flecha apunta a la deserción del alelo debido a efectos estocásticos, o (c) la cantidad justa para que dos picos de alelos estén equilibrados y en escala. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

Si la cantidad de ADN en una muestra está fuera del rango objetivo para crear un perfil de ADN "justo", se debe ajustar la cantidad de ADN antes de ponerla en la reacción de PCR. Esto involucra diluir la muestra por debajo del rango deseado o concentrarla removiendo el exceso de fluido. **(Figura 3.1)** (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

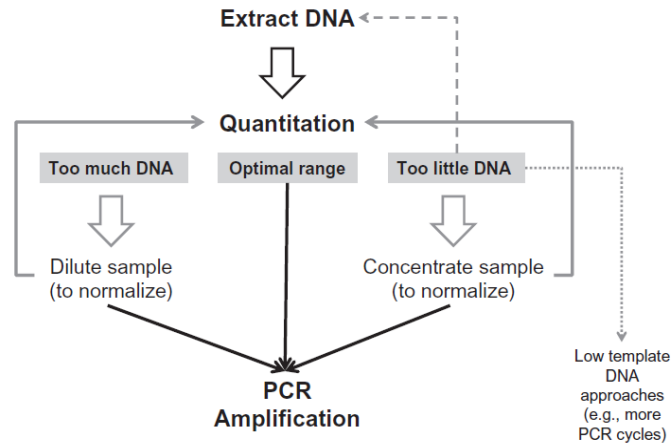


Figura 3.1 Diagrama de flujo que ilustra el papel de la cuantificación de ADN después de la extracción de ADN. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

Se han utilizado varias pruebas de cuantificación de ADN a lo largo de los años para estimar la cantidad de ADN total o ADN humano presente en una muestra. Estas pruebas de cuantificación de ADN, incluyen absorbancia UV, geles de rendimiento, transferencia de ranura, PCR de punto final y PCR cuantitativa en tiempo real, sin embargo, la mayoría de la cuantificación forense de ADN se realiza utilizando kits comerciales de proveedores y utilizando el equipo de PCR en Tiempo Real.

V.4 Amplificación de ADN por PCR de punto Final

La ciencia forense y los laboratorios de tipificación de ADN se han beneficiado enormemente de la técnica conocida como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, la cual ha revolucionado la biología molecular a través de la capacidad de hacer cientos de millones de copias de una secuencia específica de ADN en solo unas pocas horas. (Butler, J. M., 2011)

La tecnología de amplificación de ADN por PCR se adapta bien al análisis de muestras de ADN forenses porque es sensible, rápida y no está tan limitada por la calidad del ADN. Además de que se ha simplificado en los últimos años por la disponibilidad de kits de reactivos que permiten simplemente agregar una plantilla de ADN a una mezcla de PCR prefabricada que

contiene todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación. (Butler, J. M., 2011)

V.4.1 Fundamentos de PCR

PCR es un proceso enzimático en el cual una región específica de ADN es replicada una y otra vez para producir muchas copias de una secuencia particular. Este proceso de "fotocopiado" molecular implica calentar y enfriar muestras en un patrón de ciclo térmico preciso durante ~30 ciclos. Durante cada ciclo, se genera una copia de la secuencia de ADN objetivo para cada molécula que contiene la secuencia objetivo (**Figura 4.1**). Los límites del producto amplificado están definidos por cebadores oligonucleotídicos que son complementarios al extremo 3' de la secuencia de interés. En la reacción ideal con una eficiencia de amplificación del 100%, se han generado aproximadamente mil millones de copias de la región objetivo en la plantilla de ADN después de 32 ciclos. (Butler, J. M., 2011)

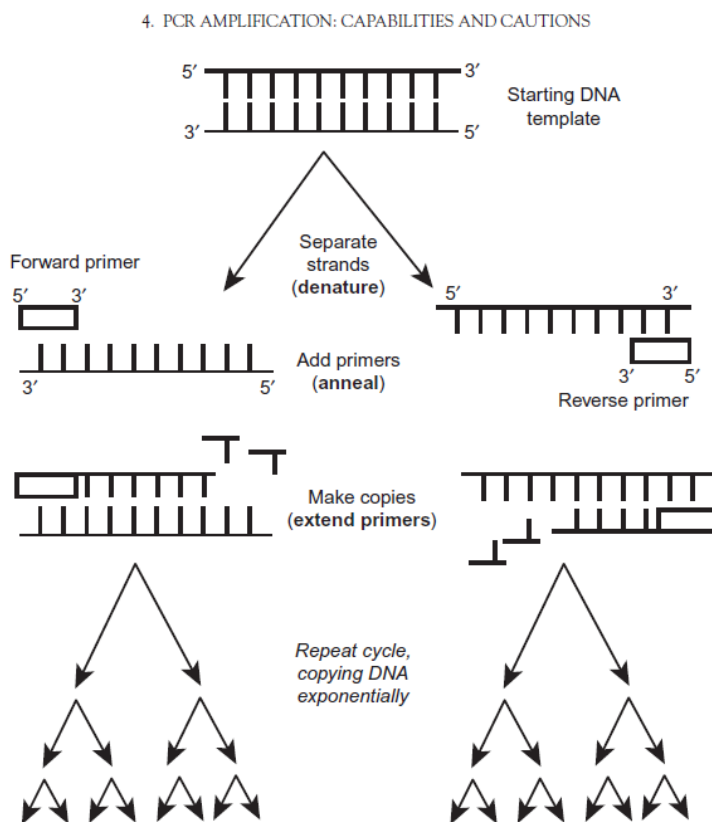
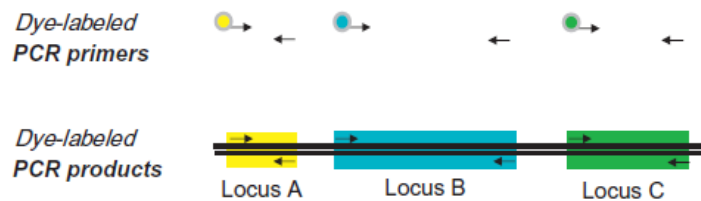


Figura 4.1 Proceso de amplificación de ADN. Primero se desnaturaliza la plantilla de ADN mediante calor. Después la muestra se enfría a una temperatura apropiada para unir los cebadores oligonucleotídicos. Finalmente, la temperatura de la muestra se eleva a la temperatura óptima para la ADN polimerasa y extiende los cebadores para producir una copia de cada cadena de plantilla de ADN. Para cada ciclo, el número de moléculas de ADN (con la secuencia entre los dos cebadores de PCR) se duplica. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

Después de la amplificación, el producto de PCR, a veces denominado "amplicón", se encuentra en cantidad suficiente para poder medirlo fácilmente mediante una variedad de técnicas, de las cuales la más común es la detección de fluorescencia. De esta manera el amplicón se marca con fluorescencia y se puede detectar cuando la etiqueta del tinte se excita a la luz de la longitud de onda adecuada. Por esta razón, los ensayos comerciales de tipificación de repetición en tándem corto (STR) etiquetan un cebador en cada par de cebadores con un tinte fluorescente (**Figura 4.2**) (Butler, J. M., 2011)

(a) Simultaneous amplification of three locations on a DNA template



(b) Resolution of PCR products with size-based separation method

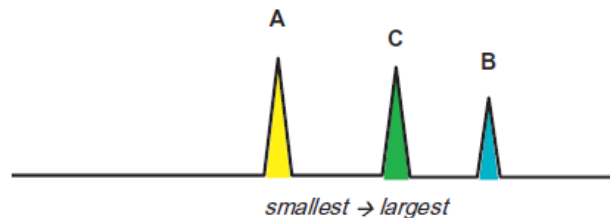


Figura 4.2 Esquema de la PCR multiplex y cómo los cebadores de PCR marcados crean productos de PCR marcados. (a) Aquí se muestran tres conjuntos de cebadores, representados por flechas, para amplificar tres loci diferentes en una plantilla de ADN. Los cebadores se diseñaron de manera que los productos de PCR para los loci A, B y C serían de diferentes tamaños y, por lo tanto, se podrían resolver con un sistema de separación basado en el tamaño (b). (figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

El proceso de amplificación por PCR, por lo tanto, tiene un doble propósito: aumentar el número de moléculas que representan un sitio objetivo específico, y unir una etiqueta, con mayor frecuencia un tinte fluorescente, permite la detección de los amplicones producidos. Tanto los elementos de amplificación como de etiquetado del proceso de PCR mejoran la sensibilidad y especificidad de detección. (Butler, J. M., 2011)

La PCR es realizada comúnmente con un volumen de muestra en un rango de 5 μ L a 100 μ L. A volúmenes tan bajos, la evaporación puede ser un problema y el pipeteo preciso de los componentes de reacción puede convertirse en un desafío. Por otro lado, los volúmenes de solución más grandes provocan problemas de equilibrio térmico para la mezcla de reacción porque lleva más tiempo transmitir un cambio de temperatura externo al centro de una solución más grande que una más pequeña. Por lo tanto, se necesitan tiempos de retención más largos a cada temperatura, lo que conduce a tiempos de ciclo térmico general más largos. Por lo tanto, la mayoría de los protocolos de biología molecular para PCR están en el rango de 20 μ L a 50 μ L. (Butler, J. M., 2011)

V.4.2 Componentes y controles de PCR

Una muestra de PCR es preparada por la mezcla de varios componentes individuales y la adición de agua desionizada para lograr el volumen y la concentración deseados de cada uno de los componentes. (Butler, J. M., 2011)

Los componentes más importantes de una muestra de PCR son los dos primers (cebadores), que son secuencias cortas de ADN que preceden o "flanquean" la región a copiar. Un primer actúa para identificar o "dirigir" la porción de la plantilla de ADN que se copiará, es un oligonucleótido sintetizado químicamente que se agrega en una alta concentración en relación con la plantilla de ADN para conducir la muestra de PCR. Se requiere un conocimiento considerable de la secuencia de ADN a copiar para seleccionar las secuencias de cebador apropiadas. (Butler, J. M., 2011)

Los otros componentes de una muestra PCR consisten de la plantilla de ADN que será copiada, estos son los bloques de construcción de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) que se suministran a cada uno de los cuatro nucleótidos, y una ADN polimerasa que agrega los bloques de construcción en el orden adecuado según la secuencia de ADN de la plantilla. Las polimerasas térmicamente estables que no se destruyen durante los pasos de temperatura de desnaturalización casi hirviendo han sido importantes para el éxito de la PCR. La polimerasa

térmicamente estable más comúnmente utilizada es *Taq*, que proviene de una bacteria llamada *Thermus aquaticus* que habita en aguas termales. (Butler, J. M., 2011)

Cuando se trabaja con un conjunto de muestras que contienen los mismos primers y componentes de reacción, es común preparar una "mezcla maestra" que luego se puede dispensar en cantidades iguales a cada tubo de PCR. Este procedimiento ayuda a asegurar una relativa homogeneidad entre las muestras. Además, al configurar un mayor número de reacciones a la vez, se pueden evitar pequeños volúmenes de pipeteo, lo que mejora la precisión de agregar cada componente (y, por lo tanto, la reproducibilidad de su método). (Butler, J. M., 2011)

V.4.2.1 Controles utilizados para controlar la PCR

Los controles son usados para controlar la efectividad de las condiciones experimentales elegidas y/o la técnica del experimentador. Estos controles típicamente incluyen un *control negativo* que es la mezcla de reacción de PCR completa sin ninguna plantilla de ADN, usualmente contiene agua o buffer del mismo volumen que la plantilla de ADN y es útil para evaluar si alguno de los componentes de la PCR ha sido contaminado por ADN (el de uno mismo o el de otra persona del laboratorio). Un "blanco" de extracción también es útil para verificar que los reactivos utilizados para la extracción de ADN estén libres de plantillas de ADN extrañas (contaminación). (Butler, J. M., 2011)

Un *control positivo* es un indicador valioso para saber si alguno de los componentes de la PCR ha fallado o no durante la fase de preparación de la reacción de los experimentos realizados. Se debe usar una plantilla de ADN estándar de secuencia conocida con ADN de buena calidad para el control positivo. Esta plantilla de ADN debe amplificarse con los mismos primers de PCR que se usan en el resto de las muestras en el lote que se está amplificando. El propósito de un control positivo es garantizar la confianza de que los componentes de reacción y los parámetros del ciclo térmico están trabajando para amplificar una región específica de ADN, (Butler, J. M., 2011) adicional a ello podemos revisar el desempeño del personal al obtener el perfil conocido y evaluar si necesita una capacitación o sigue realizándolo de manera

correcta, si los reactivos continúan cumpliendo su función aun cuando ya se encuentran abiertos, si el termociclador sigue funcionando adecuadamente, y si el método de ciclajes es adecuado.

V.5 Electroforesis Capilar (CE)

La electroforesis capilar (CE) es la metodología principal utilizada para separar y detectar alelos de repetición en tándem corto (STR) en laboratorios forenses de ADN en todo el mundo.

Para lograr una tipificación STR confiable, se deben tomar en cuenta 3 condiciones. Primero, se necesita resolución espacial para separar los alelos STR que pueden diferir en tamaño por un solo nucleótido. Segunda, se necesita resolución espectral para separar los colores de los tintes fluorescentes entre sí para poder resolver los productos de PCR de los loci marcados con diferentes tintes. En tercer lugar, la precisión del tamaño del ADN de una ejecución a otra debe ser lo suficientemente consistente para que las muestras puedan relacionarse con Allelic Ladder (ladder alélicos) que se ejecutan con fines de calibración (Butler, J. M., 2011)

V.5.1 Separación de ADN

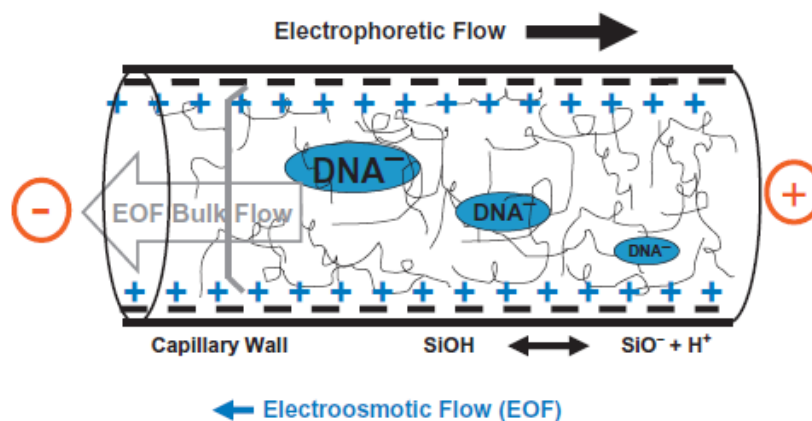


Figura 5.1 Ilustración del entorno capilar interno y las fuerzas en juego con las moléculas de ADN en movimiento a través de un tampón de polímero de tamizado. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

La **figura 5.1** muestra el ambiente interno de un capilar CE. El ADN se mueve con el flujo electroforético desde el electrodo negativo (cátodo) que se muestra a la izquierda hacia el electrodo positivo (ánodo) que se muestra a la derecha. Las hebras de polímero enredado forman poros transitorios que sirven como obstáculos para inhibir el progreso de las moléculas de ADN en función de su tamaño. Las moléculas de ADN más pequeñas pueden moverse más fácilmente a través de las obstrucciones. En la misma figura se puede observar que otra fuerza está en juego dentro del capilar. Los capilares están hechos de vidrio o sílice fundida (dióxido de silicio, SiO_2) pero tienen grupos hidroxilo (silanol, SiOH) a lo largo de las paredes internas y están cargados negativamente por encima de un pH 5. Dado que el tampón de electroforesis utilizado es típicamente alrededor de pH 8, iones positivos de la solución tampón se alinearán con los iones negativos de siloxi (SiO^-) a lo largo de las paredes creando lo que se conoce como una doble capa. (Butler, J. M., 2011)

Bajo el campo eléctrico aplicado durante la separación CE, los iones positivos migrarán hacia el electrodo negativo. El movimiento de estos iones positivos creará un flujo masivo de la solución dentro del capilar lo que se conoce como *flujo electroosmótico o EOF*. El EOF se puede reducir o eliminar recubriendo la pared capilar interna para evitar la exposición de cargas negativas a lo largo de la pared y la acumulación de iones positivos de la solución. (Butler, J. M., 2011)

V.5.2 Detección de fluorescencia

Los ensayos de detección basados en fluorescencia se usan ampliamente en laboratorios forenses debido a sus capacidades para el análisis multicolor, así como a los formatos rápidos y fáciles de usar. En la aplicación para la tipificación de ADN con marcadores STR, se une un tinte fluorescente a un primer de PCR que se incorpora a la región objetivo amplificada del ADN. Los alelos STR amplificados están representados por picos en un electroferograma a medida que las moléculas de ADN marcadas pasan el detector (**Figura 5.2**). (Butler, J. M., 2011)

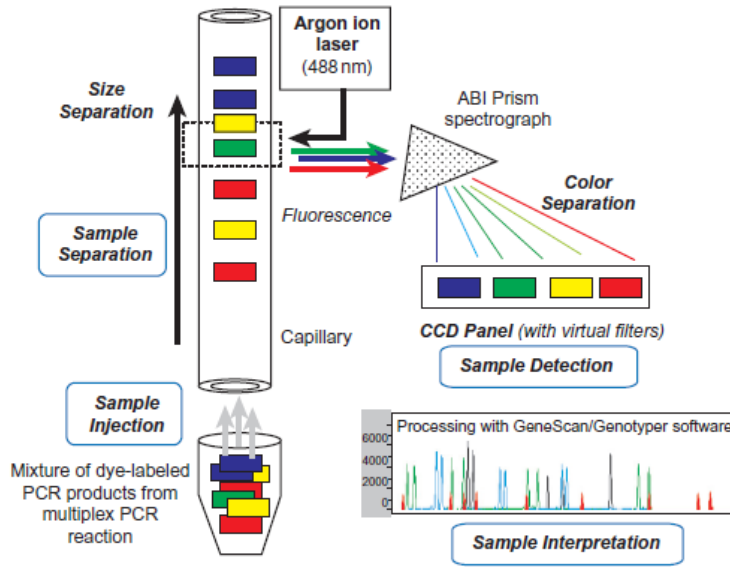


Figura 5.2 Ilustración esquemática de la separación y detección de alelos STR con un analizador genético ABI Prism 310 o un solo capilar en un ABI 3100 u otro instrumento multicapilar. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

Una ventaja significativa del marcado fluorescente sobre otros métodos es la capacidad de registrar dos o más fluoróforos por separado utilizando filtros ópticos. La señal producida debe resolverse espectralmente. Esto se logra utilizando un algoritmo de separación de color de fluoróforo conocido como matriz, que a veces se denomina "calibración espectral". Con esta capacidad multicolor, los componentes de mezclas complejas se pueden etiquetar individualmente e identificar por separado en la misma muestra. (Butler, J. M., 2011)

Un detector de fluorescencia es un dispositivo fotosensible que mide la intensidad de la luz emitida por un fluoróforo. La detección de luz de baja intensidad se puede lograr con un tubo fotomultiplicador (PMT) o un dispositivo de carga acoplada (CCD). La acción de un fotón que golpea el detector se convierte en una señal eléctrica. La fuerza de la corriente resultante es proporcional a la intensidad de la luz emitida. Esta intensidad de la luz se informa típicamente en unidades arbitrarias, como las unidades de fluorescencia relativa (RFU). (Butler, J. M., 2011)

V.5.2.1 Tintes fluorescentes y filtros de emisión

Los primers de PCR marcados con colorante etiquetan solo una hebra única de un producto de PCR. Esto simplifica la interpretación de los datos porque la cadena de ADN complementaria no es visible para el detector. Además, los primers marcados con colorante permiten que múltiples productos de PCR se etiqueten simultáneamente de manera independiente, lo que aumenta las capacidades de rendimiento porque los amplicones de tamaño superpuesto se pueden distinguir entre sí por su etiqueta colorante. (Butler, J. M., 2011)

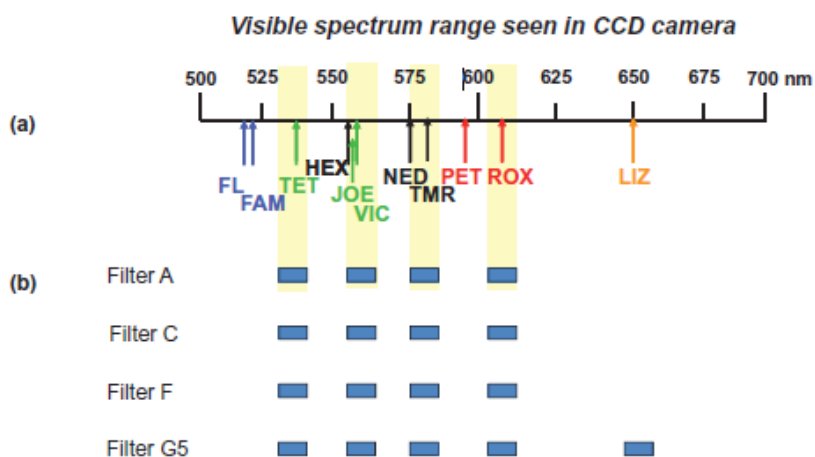


Figura 5.2.1 (a) Colorantes fluorescentes de uso común en kits de tipificación STR mostrados por color con sus máximos de emisión espectral (flechas). (b) Los conjuntos de filtros virtuales utilizados en el ABI 310 determinan de qué regiones de la cámara CCD se recoge la luz visible para la interpretación de los datos. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2011)

La **figura 5.2.1a** ilustra el rango de espectros de emisión de fluorescencia para los diferentes colorantes comúnmente utilizados para etiquetar productos de PCR en kits de tipificación de STR. Las posiciones de la luz recolectada usando varios filtros virtuales comunes en el ABI 310 se observan en la **figura 5.2.1b**. Se debe seleccionar el filtro correcto para que coincida con las combinaciones de tintes fluorescentes en uso para maximizar la sensibilidad. (Butler, J. M., 2011). Aunque actualmente ya se utilizan seis filtros en equipos más contemporáneos, que además del filtro adicional pueden correr simultáneamente desde 4 (ABI 3130) hasta 32 (ABI 3500) muestras al mismo tiempo.

V.6 Revisiones técnicas y administrativas

En las revisiones técnicas y administrativas se incluyen los requisitos mínimos que debe contener un informe de ensayo o calibración, además, de los elementos adicionales específicos para informes de ensayo. En estos informes también se permiten opiniones e interpretaciones, siempre y cuando se documenten las bases y fundamentos.

El propósito de las revisiones es asegurar que los resultados, opiniones o interpretaciones sean exactos, debidamente cualificados y apoyados por los registros técnicos, asimismo aseguran la conformidad con los métodos y documentos aplicables del sistema de gestión y cuando se encuentra una discrepancia se describe un curso de acción a tomar.

El procedimiento para la revisión técnica de registros técnicos, informes o testimonios debe ser realizada por el personal del laboratorio que ha sido sometido a un examen de competencia en las tareas que abarca la revisión, y nunca debe hacer una revisión de su propio trabajo.

Además de lo anterior que es lo que incluye la Norma ISO/IEC:17025 y ANAB para las revisiones técnicas que todos los laboratorios de ensayo y calibración deben realizar; en un laboratorio de genética forense es necesario llevar a cabo la interpretación de los resultados obtenidos a partir de la observación de un electroferograma, a veces denominado EPG o e-gram, utilizando el software de genotipado STR para producir una tabla de resultados finales que representa el perfil de ADN de la muestra biológica.

Algunas de las decisiones que los analistas deben tomar al momento de interpretar los datos electroforéticos de una muestra de referencia es que, si representan picos o ruido, si los picos son alelos o artefactos, si los alelos son homocigotos, heterocigotos o si hay alelos perdidos.

V.6.1 Umbral analítico para diferenciar entre señal y ruido

Los datos producidos en cualquier instrumento analítico contendrán "ruido" de línea de base. Por lo tanto, la señal observada debe ser lo suficientemente "alta" (tener suficiente sensibilidad para ser detectada) y lo suficientemente "clara" (tener suficiente especificidad al descifrar los componentes de la mezcla) para reflejar de manera confiable las moléculas de ADN presentes en la muestra que se está analizando. (Butler, J. M., 2014)

Los umbrales de detección de picos se establecen en los instrumentos de electroforesis capilar a un nivel tal que, si se observan "picos" por debajo de este nivel, estos "picos" se consideran indistinguibles del ruido de referencia. Solo los picos por encima de este *umbral analítico* definido por el usuario se consideran una señal analítica confiable. (Butler, J. M., 2014)

Cabe destacar que si el umbral analítico para la detección de pico de CE, es demasiado alto, se pueden perder datos útiles y llevar al analista a sacar conclusiones falsas negativas. Por otro lado, si el umbral analítico es demasiado bajo, los artefactos de ruido de línea de base pueden interpretarse como alelos que dan lugar a conclusiones falsas positivas. (**Figura 6.1**) (Butler, J. M., 2014)

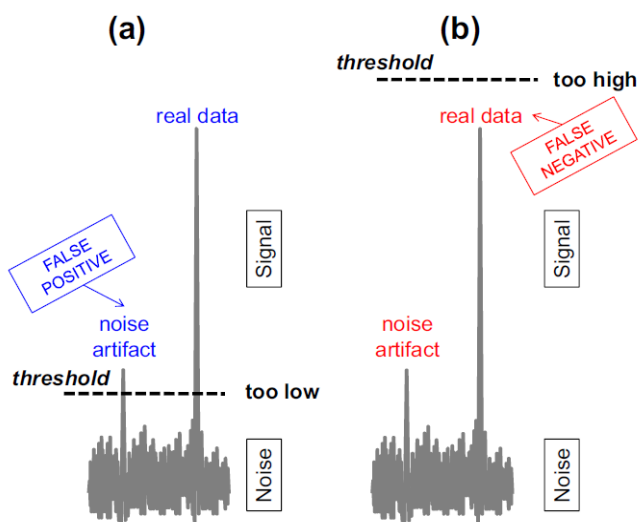


Figura 6.1 Relación de umbrales (línea horizontal discontinua) con datos detectados. (a) Si un umbral analítico de detección se establece demasiado bajo, los artefactos de ruido se pueden clasificar con datos reales. (b) Si un umbral analítico de detección se establece demasiado alto, los datos reales se excluyen falsamente junto con los artefactos de ruido. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2014)

V.6.2 Picos. ¿Alelos o artefactos?

Debido a que la tipificación forense de ADN caracteriza los loci STR utilizando tecnologías de PCR y electroforéticas, algunos datos que resultan de este esquema analítico pueden no representar alelos reales que se originan en la muestra. Por lo tanto, es necesario, antes de que los resultados de tipificación de STR se puedan usar para fines de comparación, identificar cualquier pico no alélico potencial.

Los artefactos importan porque a medida que se requiere detectar niveles más bajos de ADN, la confiabilidad de la interpretación puede verse afectada cuando se intenta diferenciar entre alelos verdaderos y artefactos de amplificación. (Butler, J. M., 2014)

De acuerdo con el SWGDAM, sobre el tema de distinguir alelos de artefactos, establece que: “los picos no alélicos pueden ser productos de PCR (stutter, adición de nucleótidos no dependiente de la plantilla y producto de amplificación no específico), artefactos analíticos (spikes y línea base elevada), limitaciones instrumentales (separación espectral incompleta que resulta en pull-up o desprendimiento del interior del capilar), o puede introducirse en el proceso (colorante cebador disociado). En general, los criterios empíricos se basan en las características cualitativas y/o cuantitativas de los picos. Como ejemplo, los artefactos de tinte y los spikes se pueden distinguir de los picos alélicos en función de la morfología y/o reproducibilidad. Los picos de adición de nucleótidos stutter y no dependientes de plantilla pueden caracterizarse en función del tamaño y la amplitud con respecto a un pico alélico”.

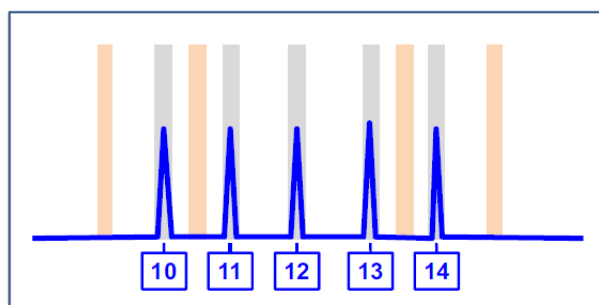
Las dificultades de interpretación pueden resultar de 1) alelos variantes con tamaños de ADN que difieren del motivo de secuencia STR esperado, 2) adición sin plantilla donde un pico adicional podría ser un alelo variante de otro contribuyente, 3) producto stutter que podría ser un alelo de una cantidad menor de otro contribuyente, y 4) un alelo nulo o silencioso donde el alelo está verdaderamente presente pero no se puede amplificar y detectar debido a una mutación en el sitio de unión del cebador. (Butler, J. M., 2014)

V.6.2.1 Alelos variantes

Los alelos variantes existen en la población humana que no coinciden con la variación esperada en el motivo de repetición central (por ejemplo, el alelo 8.1 en lugar de 8 o 9). El software de genotipado puede etiquetar estos alelos variantes como "off-ladder". Sin embargo, la observación de un alelo "off-ladder" también podría deberse a una precisión de medición deficiente o al "deslizamiento" entre el tamaño de calibración del ladder alélico y el alelo medido. (Butler, J. M., 2014)

En la **figura 6.2.1** se muestran los alelos 10, 11, 12, 13 y 14 presentes en un ladder alélico. Los contenedores físicos corresponden a alelos presentes en una escalera alélica, mientras que los contenedores virtuales pueden designarse en el software de genotipado en base a tamaños extrapolados de alelos en la escalera alélica. Los contenedores virtuales han sido definidos por los alelos 9 y 15 que son una repetición más pequeña o más grande que los contenedores físicos definidos por los alelos de ladder alélicos, y para los alelos 10.2 y 13.2, que ocurren entre alelos de escalera. Los contenedores virtuales intra-alélicos, como 10.2 y 13.2, generalmente se incluyen porque han sido observados previamente y el fabricante del kit considera que son lo suficientemente comunes como para registrarse en el conjunto establecido de contenedores de tamaño posible. Si se observara un alelo en la supuesta posición del alelo 12.2, el software de genotipado lo etiquetaría como un alelo "off-ladder" y requeriría la revisión y evaluación del analista. (Butler, J. M., 2014)

Figura 6.2.1 Ilustración de datos de un ladder alélico superpuestos en contenedores físicos y virtuales. Cualquier pico que caiga fuera de una ventana del contenedor está etiquetado como "off-ladder" y necesitaría ser revisado para su consideración como un posible alelo variante o un artefacto. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2014)



Physical bins: 10, 11, 12, 13, 14

Virtual bins: 9, 10.2, 13.2, 15

Los alelos que contienen alguna forma de variación de secuencia en comparación con los alelos comúnmente observados a menudo se denominan alelos *variantes o microvariantes* porque son solo ligeramente diferentes de los alelos de repetición completa. Debido a que los alelos microvariantes a menudo no tienen el mismo tamaño que los alelos de consenso comúnmente observados presentes en el ladder alélico de referencia, se les puede denominar alelos "off-ladder". (Butler, J. M., 2014)

V.6.2.2 Adición sin plantilla

La ADN polimerasa, particularmente la *Taq* polimerasa utilizada en la PCR, a menudo agrega un nucleótido adicional al extremo 3' terminal de un producto de PCR mientras copian la cadena de plantilla. Esta adición sin plantilla suele ser adenosina y, por lo tanto, a veces se le denomina "adenilación" o la forma "+A" del amplicón. La adición sin plantilla da como resultado un producto de PCR que es un par de bases más largo que la secuencia objetivo real. (Butler, J. M., 2014)

V.6.2.3 Producto stutter

Un electroferograma generalmente revela la presencia de pequeños picos de varias bases más cortas que cada pico de alelo de STR. Estos picos de "*producto stutter*" resultan del proceso de PCR cuando los loci STR se copian mediante una ADN polimerasa. Un producto de stutter también se conoce como una banda de sombra o un producto de deslizamiento de ADN polimerasa. (Butler, J. M., 2014)

Un posible mecanismo que se ha propuesto para explicar la existencia de productos de stutter es el mal emparejamiento de hebras deslizantes. En este modelo una región del complejo cebador-plantilla se desvanece durante la extensión del cebador, lo que permite el deslizamiento de la hebra cebadora o plantilla de tal manera que una repetición forme un bucle no emparejado (Levinson, G., & Gutman, G. A., 1987)

La consecuencia de este ciclo de repetición es un producto de PCR acortado que es menor que el amplicón primario (alelo STR) en una sola unidad de repetición. El análisis de secuencia de productos stutter del locus de repetición del tetranucleótido vWA encontró que contienen una unidad de repetición menor que el pico del alelo principal correspondiente (Walsh et al., 1996).

Si el pico del alelo objetivo está fuera de escala, entonces el producto stutter puede parecer más grande de lo que realmente es en relación con el pico del alelo correspondiente (Moretti, T. R., et al., 2001). Para la interpretación de los datos, algunos laboratorios aplican un filtro de stutter universal, generalmente en el rango de 10% a 20%. Un filtro de stutter implementado por software de genotipado elimina automáticamente las etiquetas de los picos en los picos encontrados dentro del rango de tamaño designado y la altura relativa (por ejemplo, 10% a 20%) de los picos del alelo STR.

El porcentaje de formación de producto stutter sin utilizar un filtro de stutter para un alelo se determina simplemente dividiendo la altura del pico stutter por la altura del pico del alelo correspondiente como se ve en la **figura 6.2.3**. (Butler, J. M., 2014)

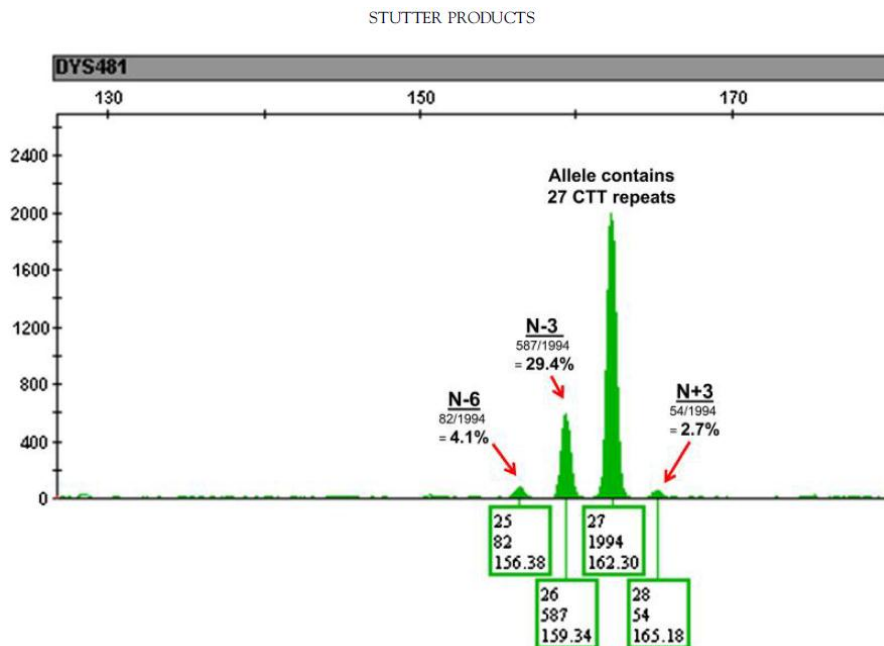


Figura 6.2.3 Productos stutter observados en el marcador de trinucleótido Y-STR DYS481 de una muestra de ADN masculino de una sola fuente cuando se amplifica con el kit PowerPlex Y23. Los cálculos de los porcentajes de tartamudeo se realizaron utilizando alturas máximas. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2014).

Los productos stutter impactan la interpretación de los perfiles de ADN, especialmente en los casos en que dos o más individuos pueden haber contribuido a la muestra de ADN. Debido a que los productos stutter tienen la misma longitud que los productos de PCR de alelos reales, puede ser difícil determinar si un pico pequeño es un alelo real de un contribuyente menor de la muestra original o un producto de tartamudeo de un alelo adyacente creado durante el proceso de amplificación de PCR. (Butler, J. M., 2014)

Aunque un stutter generalmente se considera un aspecto indeseable de la tipificación STR, también puede ayudar a la interpretación de datos en algunas situaciones. Los artefactos como spikes y picos de pull-up de datos fuera de escala en otro canal de tinte, se pueden distinguir de los alelos STR verdaderos porque no tendrán ningún producto stutter asociado con ellos. Por supuesto, la señal para el verdadero alelo debe ser lo suficientemente alta como para detectar el stutter. (Butler, J. M., 2014)

V.6.2.4 Alelo nulo o silencioso (*alelo drop-out*)

Cuando se amplifican fragmentos de ADN que contienen regiones repetidas STR, es posible tener un fenómeno conocido como *alelo drop-out*. Un alelo drop-out se define como la condición en la que no se puede visualizar un alelo y es posible cuando las áreas de pico o las alturas son muy bajas. Este fenómeno debe entenderse, ya que puede dar la falsa impresión de que el genotipo es un homocigoto. (Buckleton, J., 2005)

Estas variaciones pueden ocurrir en tres ubicaciones (en relación con los sitios de unión del primer) dentro de la región de repetición, en la región de flanqueo o en la región de unión del primer como se observa en la **figura 6.2.4**.

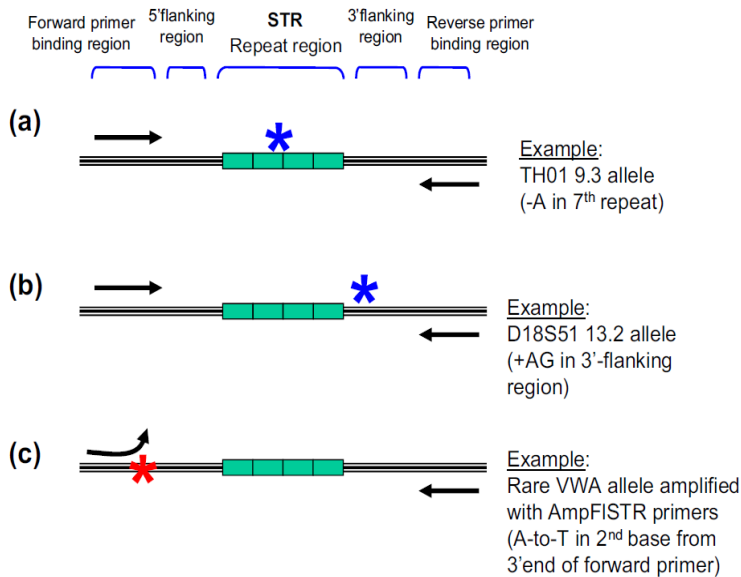


Figura 6.2.4 Posible variación de secuencia en o alrededor de las regiones repetidas de STR y el impacto en la amplificación por PCR. El asterisco simboliza una diferencia de ADN (cambio de base, inserción o eliminación de un nucleótido) de un alelo típico para un locus STR. (a) La variación ocurre dentro de la región de repetición. (b) La variación de secuencia ocurre justo fuera de la repetición en la región de flanco, pero dentro de los sitios de unión del

primer. c) La PCR puede fallar debido a una interrupción en el sitio de unión de un primer porque el primer ya no coincide perfectamente con la secuencia de plantilla de ADN. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2014)

Si se produce un cambio en el par de bases en la plantilla de ADN en la región de unión del cebador de PCR, la hibridación del cebador se puede interrumpir, lo que da como resultado una falla en la amplificación y, por lo tanto, falla en la detección de un alelo que existe en el ADN de la plantilla. La plantilla de ADN existe para un alelo particular pero no puede amplificarse durante la PCR debido a problemas de hibridación del cebador. Este fenómeno da como resultado lo que se conoce como un *alelo nulo*. Afortunadamente, los alelos nulos son bastante raros porque la secuencia de flanco alrededor de las repeticiones STR es bastante estable y consistente entre las muestras.

Los alelos nulos generalmente se descubren a través de estudios de concordancia que usan cebadores de PCR que se unen a diferentes porciones de la región flanqueante para el mismo locus, (Butler, J. M., 2014) por ejemplo, amplificar con diferentes kits de dos casas comerciales que utilizan una configuración molecular diferente, ya sea aumentando o disminuyendo su tamaño o cambiándolo de canal (fluorocromo).

V.6.3 Alelos heterocigotos, homocigotos o alelos perdidos

En general, un individuo será homocigoto o heterocigoto en cada ubicación genética probada. Los loci homocigotos poseen alelos que son electroforéticamente indistinguibles y, por lo tanto, solo se detectará un único pico de CE. (Butler, J. M., 2014)

Los loci STR heterocigotos poseen dos alelos que son diferentes en tamaño de amplicón general. Las alturas de estos dos alelos "hermanos" se pueden comparar en muestras de una sola fuente para permitir suposiciones de genotipo en muestras que contienen más de un contribuyente. Esta comparación de las alturas máximas de los alelos hermanos se denomina comúnmente cálculo de la relación de altura máxima (PHR) o equilibrio de heterocigotos (Hb). (Butler, J. M., 2014)

A menudo, los alelos de menor tamaño se amplifican ligeramente mejor que los alelos de mayor tamaño. Esto se conoce como *amplificación preferencial*, que es el muestreo desigual de los dos alelos presentes en un locus heterocigoto. La variabilidad de la amplificación por PCR ocurre particularmente con cantidades menores de ADN. Aunque dos alelos están presentes en un locus STR en cantidades iguales en la plantilla de ADN, puede ocurrir una variación estocástica (es decir, aleatoria) en las primeras rondas de la PCR y conducir a la amplificación selectiva de un alelo sobre el otro. Por lo tanto, las relaciones de altura de pico para heterocigotos rara vez serán del 100% cuando ambos alelos son cuantitativamente iguales en la señal de altura de pico detectada. (Butler, J. M., 2014)

El PHR puede variar según el locus, la separación del tamaño del alelo y la cantidad de plantilla de ADN. (Leclair, B., et al., 2004). En general, los valores de PHR disminuirán con cantidades más bajas de plantilla de ADN que se prueba hasta que se produzca un *alelo drop-out* (**Figura 6.3**). Un *alelo drop-out* es una extensión de la diferencia de amplificación que se observa cuando las alturas de pico heterocigóticas son desiguales. Ante la observación de un solo alelo y la posibilidad de alelo drop-out, un analista no siempre puede distinguir si este es un verdadero heterocigoto que se hace pasar por un homocigoto. Por esta razón, se pueden establecer *umbrales estocásticos* para proporcionar un grado de comodidad con respecto a lo

que es un verdadero homocigoto contra un heterocigoto que le falta un alelo debido a la deserción (ya sea por efectos estocásticos o una mutación en el sitio de unión del cebador). (Butler, J. M., 2014)

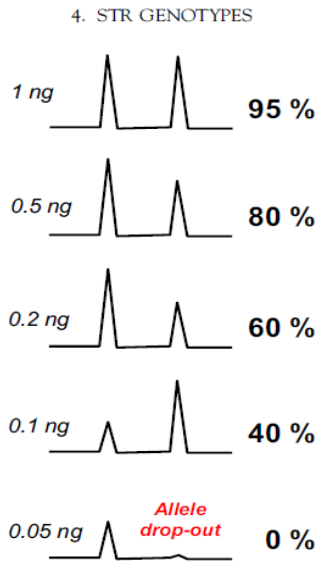


Figura 6.3 Alelos heterocigotos hipotéticos que ilustran la tendencia general de que el equilibrio heterocigótico disminuye con los niveles de la plantilla de ADN hasta que uno de los alelos no puede amplificarse. Cuando se produce un alelo drop-out (que se muestra aquí en el nivel de plantilla de ADN de 0,05 ng), se observa un falso homocigoto. Aquí los valores de PHR se muestran como un porcentaje del alelo de altura más corta al alelo de altura más alta. (Figura tomada de: Butler, J. M., 2014)

V.6.3.1 Umbral estocástico

La amplificación de muestras que contienen ADN de bajo nivel puede estar sujeta a efectos estocásticos, donde dos alelos en un locus heterocigótico exhiben alturas de pico considerablemente diferentes (es decir, relación de altura de pico generalmente <60%) o un alelo no puede amplificarse a un nivel detectable (es decir, alelo drop-out). Los efectos estocásticos dentro de una reacción de amplificación pueden afectar uno o más loci independientemente del tamaño del locus o del alelo. (SWGAM, 2017)

Se puede aplicar un umbral para alertar al analista de ADN de que toda la información de tipificación de ADN puede no haberse detectado para una muestra dada. Este umbral, denominado umbral estocástico, se define como el valor de la altura del pico por debajo del cual es razonable suponer que la pérdida alélica puede haber ocurrido dentro de una muestra de una sola fuente. Esta definición de umbral estocástico puede no ser apropiada para la interpretación de mezclas cuando es posible compartir alelos, incluidos los efectos de compartir entre stutter y picos de alelos menores; sin embargo, un umbral estocástico aún puede ser útil

para proporcionar una indicación de que pueden faltar datos (es decir, cuando los datos están presentes por debajo de ese umbral). (SWGDM, 2017)

VI. Resultados y discusión

Cada ensayo incluía tres tipos de muestras, las cuales eran, un hisopo con una mezcla de sangre y semen, una muestra de sangre en papel FTA y un tubo con polvo de diente.

Los ensayos primero fueron realizados por el personal encargado del aseguramiento de la calidad del laboratorio para saber cuáles tenían que ser los resultados y posteriormente poder compararlos.

Después de que el ADN de cada muestra fue extraído, cuantificado y genotipificado, se realizó la revisión de 6 ensayos de desempeño y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

VI.1 Resultados de la muestra del hisopo con la mezcla de sangre y semen

Tabla 1. Resultados previos de las pruebas presuntivas y confirmativas.

Pruebas presuntivas			Prueba confirmativa
ABAcad® HemaTrace®	ABAcad® p30	Fosfatasa ácida	Tinción Christmas Tree
Positiva	Positiva	-	Positiva

(-) Significa que no se realizó esa prueba

Tabla 2. Resultados obtenidos por los peritos de las pruebas presuntivas y confirmativas.

Perito	Pruebas presuntivas			Prueba confirmativa
	ABAcad® HemaTrace®	ABAcad® p30	Fosfatasa ácida	Tinción Christmas Tree
1	-	Positiva	-	Positiva
2	-	Positiva	Positiva	Positiva
3	-	Positiva	Positiva	Positiva
4	Positiva	Positiva	-	Positiva
5	-	Positiva	-	Positiva
6	-	Positiva	-	Positiva

(-) Significa que el analista no realizó esa prueba.

Las **tablas 1 y 2** muestran los resultados de las pruebas presuntivas y confirmativa, los cuales fueron positivos tanto en los resultados previos como en los emitidos por los analistas. La prueba ABACard® p30 fue realizada por todos los analistas, sin embargo, como solo es una prueba presuntiva es necesario llevar a cabo pruebas adicionales como la Tinción de Christmas Tree para confirmar la presencia de semen, ya que la muestra ideal para obtener un perfil genético es una célula nucleada y dado que el semen puede no contener espermatozoides, para poder realizar un análisis de Genética Forense se requiere tener células espermáticas para la obtención de un perfil masculino, por lo tanto, esta técnica es la más confiable ya que el semen es el único fluido corporal que contiene células espermáticas.

En la **tabla 4** se observan las fracciones femenina y masculina, los cuales fueron obtenidas a partir de una separación celular y su posterior extracción de ADN. En la fracción masculina se obtuvo un perfil genético de un individuo de sexo masculino y mediante la base de datos se logró establecer la probabilidad de coincidencia al azar la cual fue de 1 entre 1.5×10^{23} individuos. La probabilidad de coincidencia al azar, se utiliza para determinar qué tan probable es que el mismo perfil genético de un individuo se repita en la población y dado que la población mundial actual es de 7,700,000,000 aproximadamente, el perfil se repetiría sólo si tuviéramos una población mundial de 150, 000, 000, 000, 000, 000, 000 individuos.

Respecto a la fracción femenina se observó un perfil con una mezcla de perfiles genéticos, esto se pudo determinar por dos razones, la primera es que más de dos alelos estaban presentes en múltiples loci y la segunda es que otros loci si tenían dos alelos, pero las relaciones de altura de pico excedían las relaciones de pico esperadas para muestras de una sola fuente.

En general, todos los resultados emitidos por los analistas a partir de esta muestra fueron los esperados ya que coincidieron con los mostrados en la **tabla 3** y cabe destacar que las técnicas no fueron las mismas, por ejemplo, al hacer la separación celular los analistas 5 y 6 lo hicieron mediante una lisis celular y en cuanto a la extracción de ADN todos utilizaron una técnica diferente en comparación con la que se utilizó en los análisis previos.

VI.1.2 Perfiles genéticos obtenidos después de la separación celular y extracción de la muestra del hisopo con la mezcla de sangre y semen.

Tabla 3. *Perfiles obtenidos previamente en la fracción femenina y en la fracción masculina.*

Perfil		Técnica utilizada	
Fracción femenina	Fracción masculina	Separación celular	Extracción de ADN
Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Kit Differex System	Kit DNA IQ System de uso manual
Coincidencia genética al azar del perfil de sexo masculino: 1 entre 1.5×10^{23} individuos			

Tabla 4. *Perfiles obtenidos por los peritos de la fracción femenina y de la fracción masculina.*

Perito	Perfil		Técnica utilizada	
	Fracción femenina	Fracción masculina	Separación celular	Extracción de ADN
1	Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Kit Differex System	Kit PrepFiler Express Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
2	Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Kit Differex System	Kit PrepFiler Express Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
3	Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Kit Differex System	Kit PrepFiler Express Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
4	Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Kit Differex System	DNA IQ Casework Pro Kit de uso manual
5	Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Lisis diferencial	Kit PrepFiler Express Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
6	Mezcla de perfiles genéticos	Perfil genético masculino	Lisis diferencial	Kit PrepFiler Express Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
Coincidencia genética al azar del perfil de sexo masculino: 1 entre 1.5×10^{23} individuos				

VI.2 Resultados de la muestra de sangre en papel FTA

Se utilizaron dos muestras de sangre en papel FTA ya que una no fue suficiente para todos los ensayos preparados y los resultados previos fueron los siguientes:

Tabla 5. Perfiles genéticos obtenidos previamente de las dos muestras

Muestra 1			Muestra 2		
Perfil genético	Coincidencia al azar	Técnica de extracción de ADN	Perfil genético	Coincidencia al azar	Técnica de extracción de ADN
Perfil genético femenino	1 entre 3.1×10^{21} individuos	Kit DNA IQ System de uso manual	Perfil genético femenino	1 entre 4.72×10^{22} individuos	Kit DNA IQ System de uso manual

Tabla 6. Perfil genético obtenido por los peritos según la muestra que se les proporcionó.

Perito	Muestra	Perfil genético	Coincidencia al azar	Técnica de extracción de ADN
1	1	Perfil genético femenino	1 entre 3.1×10^{21} individuos	Kit IQ System de uso manual
2	1	Perfil genético femenino	1 entre 3.1×10^{21} individuos	Kit IQ System de uso manual
3	1	Perfil genético femenino	1 entre 3.1×10^{21} individuos	Kit IQ System de uso manual
4	1	Perfil genético femenino	1 entre 3.1×10^{21} individuos	Kit IQ System de uso manual
5	2	Perfil genético femenino	1 entre 4.72×10^{22} individuos	Kit IQ System de uso manual
6	1	Perfil genético femenino	1 entre 3.1×10^{21} individuos	Kit IQ System de uso manual

Todos los resultados de las muestras de sangre en papel FTA de los analistas (**Tabla 6**) coinciden con los resultados previos (**Tabla 5**), el perfil genético en todos los casos corresponde

a un individuo de sexo femenino con una coincidencia al azar de 1 entre 3.1×10^{21} , a excepción del perfil obtenido por el analista 5 ya que dicho analista trabajo con la muestra 2 y la coincidencia al azar fue de 1 entre 4.72×10^{22} individuos.

VI.3 Resultados de la muestra de polvo de diente

A cada perito se le proporcionó un tubo con polvo de diente diferente y los resultados fueron los siguientes.

Tabla 7. Resultados previos y obtenidos por los peritos de acuerdo a la muestra que se les proporcionó

Perito	Resultados previos			Resultados de los peritos		
	Perfil genético	Coincidencia genética	Técnica de extracción de ADN	Perfil genético	Coincidencia genética	Técnica de extracción de ADN
1	Perfil genético masculino	1 entre 2.69×10^{20} individuos	Extracción de ADN por técnica orgánica	Perfil genético masculino	1 entre 2.69×10^{20} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
2	Perfil genético masculino	1 entre 3.7×10^{20} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express	Perfil genético masculino	1 entre 3.7×10^{20} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
3	Perfil genético masculino	1 entre 2.81×10^{21} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA	Perfil genético masculino	1 entre 2.81×10^{21} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA

			Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express			Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
4	Perfil genético femenino	1 entre 2.91×10^{20} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express	Perfil genético femenino	1 entre 2.91×10^{20} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
5	Perfil genético femenino	1 entre 1.10×10^{24} individuos	Extracción de ADN por técnica orgánica	Perfil genético femenino	1 entre 1.10×10^{24} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express
6	Perfil genético masculino	1 entre 8.62×10^{21} individuos	Extracción de ADN por técnica orgánica	Perfil genético masculino	1 entre 8.62×10^{21} individuos	Kit PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction en el sistema automatizado AutoMate Express

Por último, en los resultados de las muestras de polvo de diente, todos coincidieron con los resultados previos que ya estaban almacenados en la base de datos, por lo tanto, se pudo determinar la coincidencia al azar de cada muestra (**Tabla 7**) y el desempeño del personal, equipos, métodos y reactivos.

VII. Conclusiones

De acuerdo con lo expuesto en este trabajo, los ensayos de competencia, desempeño y aptitud juegan un papel muy importante al momento de asegurar los resultados emitidos por el personal de un laboratorio de genética forense, ya que estos ensayos ayudan a saber si los analistas son competentes en el trabajo para el cual son empleados, si desempeñan correctamente su trabajo, o por el contrario si necesitan estar más capacitados.

Respecto a los resultados emitidos por el personal de este laboratorio se logró comprobar la competencia y desempeño del personal así como también el de los equipos, reactivos y métodos ya que de acuerdo a la comparación de dichos resultados contra los obtenidos previamente de las mismas muestras control se observó que fueron idénticos a pesar de que los ensayos fueron realizados por analistas diferentes, en días diferentes y algunos incluso utilizando diferentes técnicas, por lo tanto, es posible concluir que los resultados fueron reproducibles.

En conclusión, es necesario que los analistas estén familiarizados con todas las técnicas empleadas para la identificación de ADN y con la interpretación de los perfiles genéticos, ya que de esta manera comprenderán como tratar las muestras desde el momento de su recolección hasta el momento de la interpretación de los perfiles genéticos donde ellos podrán explicar los datos obtenidos en un caso de la manera más clara e imparcial posible, evitando dar interpretaciones o conclusiones erróneas.

VIII. Glosario

Alelo: una forma de un gen que se encuentra en una ubicación específica en un cromosoma específico. Los alelos dirigidos en el análisis STR varían en longitud.

Artefacto: un producto no alélico del proceso de amplificación (por ejemplo, stutter, adición de nucleótidos sin plantilla u otro producto no específico), una anomalía del proceso de detección (por ejemplo, pull-up o spike), o un subproducto de la síntesis del primer.

Drop-out (abandono): cuando uno o más alelos presentes en una muestra no se observan por encima del umbral analítico.

Efectos estocásticos: a observación del desequilibrio máximo intra-locus y / o abandono de alelos como resultado de la amplificación desproporcionada y aleatoria de alelos en muestras de plantillas de baja cantidad.

Genotipo: resultados del análisis de STR autosómico de un individuo en uno o más loci genéticos.

Heterocigoto: un individuo que tiene diferentes alelos en un locus particular; generalmente se manifiesta como dos picos distintos para un locus en un electroferograma.

Homocigoto: un individuo que tiene los mismos alelos (o indistinguibles) en un locus particular; manifestado como un pico único para un locus en un electroferograma.

Locus: la ubicación física específica de un gen en un cromosoma. En el análisis forense de ADN, se refiere a los sitios específicos que se prueban (por ejemplo, D3S1358, vWA o D5S818).

Muestra conocida: material biológico para el cual se establece la identidad del donante y se utiliza para fines de comparación.

Muestra de referencia: también conocida como muestra conocida o estándar de referencia.

Muestra problema: muestra biológica recuperada de una escena del crimen o recolectada de personas u objetos asociados con un crimen.

Proporción de altura de pico (PHR): la proporción relativa de dos alelos en un locus determinado, determinada mediante la división de la altura de pico de un alelo con un valor de unidad de fluorescencia relativa (RFU) más bajo por la altura de pico de un alelo con un valor de RFU más alto, y luego multiplicando este valor por 100 para expresar el PHR como porcentaje; se usa como una indicación de qué alelos pueden ser pares heterocigotos.

Ruido: señal de fondo detectada por un instrumento de recopilación de datos

Stutter: un pico menor típicamente se observa como una unidad repetida más pequeña que un alelo STR primario resultante del deslizamiento de la cadena durante la amplificación.

STR (Short Tandem Repeat - Repeticiones en tándem cortas): Son las regiones de ADN con unidades de repetición de 2pb a 7pb de longitud, también son denominadas microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR).

Umbral analítico: el requisito de altura mínima en y por encima del cual los picos detectados se pueden distinguir de manera confiable del ruido de fondo; los picos por encima de este umbral generalmente no se consideran ruido y son artefactos o alelos verdaderos.

Umbral estocástico: el valor de la altura del pico por debajo del cual es razonable suponer que, en un locus dado, puede haber ocurrido un abandono alélico de un alelo hermano en un par heterocigoto.

IX. Bibliografía

Alhassan, A., Iseki, H., Kim, C., Yokoyama, N. & Igarashi, I. (2007). *Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of Theileria equi infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates*. *Trop. Tropical Animal Health and Production* 39: 369–374.

ABAcad® *p30 Test for the forensic Identification of semen*.

Buckleton, J, Triggs, C. M & Walsh, S. J. (2005). *Biological Basis for DNA Evidence*. En *forensic DNA Evidence Interpretation* (32-36). Boca Raton, Florida: CRC PRESS.

Butler, J. M. (2011). *DNA Extraction Methods*. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. (29-47). San Diego: Elsevier Science & Technology.

Butler, J. M. (2014). *Advanced topics in forensic DNA typing: Interpretation*. Saint Louis: Elsevier Science & Technology.

Clark, J. M. (1988). *Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases*. *Nucleic Acid Research*, 16, 9677e9686.

Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. *Ensayos de aptitud*. EMA

Ferguson, E. (2014). *Effects of pH on binding of DNA using the PrepFiler BTA™ forensic DNA extraction kit on the AutoMate express™ DNA extraction system* (Order No. 1556264). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (1540749516). Retrieved from <http://www.bidi.uam.mx:8331/login?url=https://bidi.uam.mx:8889/docview/1540749516?accountid=37347>

Hernández, A., Fabela, M & Martínez, M. (2001). *Sistemas de calidad y acreditación aplicados a laboratorios de prueba*. En Secretaría de Comunicaciones y Transportes (Publicación Técnica No. 185) Querétaro: Instituto Mexicano del Transporte.

Hyun, Ja, et al. (2012). *Body fluid identification in forensics*. *BMB Reports*, 45(10), 545-553.

ISO/IEC 17025 Vigente, *Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*.

ISO/IEC 17043:2010 *Evaluación de la conformidad - Requisitos generales para los ensayos de aptitud*. *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*.

Johnston S., Newman J. & Frappier R. (2003). *Validation Study of the Abacus Diagnostics ABACard® HemaTrace® Membrane Test for the Forensic Identification of Human Blood*. Canadian Society of Forensic Science Journal, 36:3, 173-183.

Kayser, M. & Knijff, P. (2011) *Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology*. Nat. Rev. Genet. **12**, 179-192.

Leclair, B., et al. (2004). *Systematic analysis of stutter percentages and allele peak height and peak area ratios at heterozygous STR loci for forensic casework and database samples*. Journal Forensic Sciences, 49, 968e980.

Levinson, G., & Gutman, G. A. (1987). *Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution*. Molecular Biology Evolution, 4(3), 203e221.

Lounsbury, J. A., Nambiar, S. M., Karlsson, A., Cunniffe H., Norris J. V., Ferrance, J. P., & Landers. J. P. (2014). *Enhanced recovery of spermatozoa and comprehensive lysis of epithelial cells from sexual assault samples having a low cell counts or aged up to one year*. Forensic Science International: Genetics, 8, 84-89. 2019, julio 20, De ScienceDirect Base de datos.

McKiernan H.E. & Danielson, P.B. (2017). *Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science*. Molecular Diagnostics (371-394). Academic Press: Elsevier.

Moretti, T. R., et al. (2001). *Validation of STR typing by capillary electrophoresis*. Journal of Forensic Sciences, 46, 661e676.

Sardiñas, O & Hernández M. (2001, Julio 19). *Aseguramiento de la calidad en un laboratorio acreditado*. Revista cubana de higiene y epidemiología, (40), 16-9.

Stray, J.E., et al. (2010). *Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping*. Forensic Science Review, 22, 159–175.

SWGAM. (2017). *Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories*.

Tereba, A. M., et al. (2004). *Simultaneous isolation and quantitation of DNA*. U.S. Patent 6,673,631.

Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). *Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene*. Forensic Science International, 188, 1-17.

Walsh, P. S., et al. (1996). *Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA*. Nucleic Acids Research, 24, 2807e2812.