



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Reporte de servicio social

“Procedimientos empleados en el Laboratorio de Genética Forense
para la obtención de un perfil genético a partir de muestras biológicas,
para el reconocimiento humano”

Pertenece al Proyecto genérico:

Aspectos sociosanitarios, políticos y legales de la práctica profesional del Q.F.B.

Alumna: Alma Roxana Pulido Villasana

Matrícula: 204351756

Asesora interna: Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

Lugar de realización del servicio social: Laboratorio de Genética Forense de la
Coordinación General de Servicios Periciales pertenecientes a la Procuraduría
General de Justicia del Distrito Federal (Actualmente Fiscalía General de Justicia
de la Ciudad de México)

Fecha de inicio: 24 de Junio de 2009
Fecha de término: 16 de Marzo de 2010

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	3
I.	ANTECEDENTES	4
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III.	JUSTIFICACIÓN	6
IV.	OBJETIVOS:	7
V.	MARCO TEÓRICO	7
	1. El ADN	7
	2. GENES, SECUENCIA CODIFICANTE Y SECUENCIA NO CODIFICANTE	9
	3. TIPOS DE REPETICIONES EN TANDEM	11
	4. EL ADN EN LA GENÉTICA FORENSE (LA HUELLA GENÉTICA)	12
	5. PERFIL GENÉTICO	15
	6. MARCADORES GENÉTICOS.....	18
	6.1 Marcadores STR o Short Tandem Repeats	18
	6.2 Marcadores SNP o Single Nucleotide Polymorphisms	18
	6.3 Marcadores de ADN mitocondrial	18
	7. PROCEDIMIENTO PARA OBTENER PERFILES GENÉTICOS.....	18
	8. ETAPA 1: RECOLECCIÓN DE UNA MUESTRA DUBITADA O DE REFERENCIA (TRABAJO DE CAMPO)	20
	9. ETAPA 2. PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN PERFIL GENETICO EN EL LABORATORIO DE GENETICA FORENSE	22
	9.2 EXTRACCIÓN DE ADN	22
	9.3 CUANTIFICACION Y AMPLIFICACIÓN DE ADN	29
VI.	METODOLOGÍA	40
VII.	CONCLUSION	42
VIII.	BIBLIOGRAFIA	43

I. INTRODUCCIÓN

La ciencia forense es una disciplina multidisciplinaria que aplica métodos científicos y técnicos para investigar delitos y analizar evidencias físicas. Su objetivo principal es aportar pruebas objetivas y científicas que ayuden al sistema de justicia a reconstruir los hechos, determinar responsabilidades y evitar la impunidad.

Las ciencias forenses aplican principios y metodologías científicas para analizar las pruebas recogidas en las escenas del crimen, lo que en última instancia ayuda a identificar, detectar, examinar y condenar a los delincuentes. Este campo atractivo y emergente comprende varias disciplinas, entre ellas la biología forense, la química forense, la balística, la informática forense, la antropología forense, la patología y la genética forense, cada una de las cuales desempeña funciones independientes pero cooperativas en las investigaciones criminales y las decisiones judiciales.

La ciencia forense ha evolucionado significativamente en las últimas décadas, transformándose en un soporte técnico esencial para los sistemas de justicia penal en todo el mundo. Dentro de este campo, la genética forense se ha consolidado como una de las herramientas más avanzadas y confiables para la identificación humana, permitiendo individualizar a las personas con un nivel de certeza que otras disciplinas difícilmente alcanzan.

La genética forense es un área de estudio y aplicación que incluye un conjunto de conocimientos de la genética y la biología molecular, que son necesarios para la resolución de casos de orden jurídico. Entre los tipos de pericias más solicitados a los laboratorios de genética forense por los tribunales se encuentran la prueba biológica de paternidad, identificación biológica de restos cadavéricos e identificación de muestras biológicas derivadas de casos criminales (saliva, sangre, cabellos, semen, entre otros).

Es importante señalar que se atienden casos de carácter penal que implican el apoyo a instituciones de procuración e impartición de justicia. Debido al tipo de muestras con que se trabaja y el tipo de relaciones de parentesco que se busca resolver se cuenta con una amplia batería de sistemas de identificación, y también se cuenta con sistemas de identificación para linajes con base en marcadores sexuales, empleado para los estudios vinculados con línea paterna y casos de abuso sexual, asimismo con un sistema de identificación para el estudio del cromosoma X que es requerido en casos especiales que se relacionan con la herencia de dicho cromosoma, estudios de hermanos, abuelos, padres-hijas entre muchos otros. Finalmente se encuentra también con marcadores para muestras altamente degradadas y/o en cantidad mínima crítica, que comprenden los más novedosos y nuevos sistemas de identificación humana, que han permitido la identificación en casos con pocas alternativas.

La genética forense es vital en México para la procuración de justicia, la resolución de crímenes violentos y la identificación humana, a través, del análisis de ADN,

permite vincular sospechosos con la escena del crimen y establecer la verdad con base científica.

I. ANTECEDENTES

La genética forense es una apasionante disciplina científica en constante evolución. Tradicionalmente se la ha considerado como una subespecialidad de la Genética y de la Medicina Legal. Sin embargo, en los últimos años ha adquirido una entidad propia, su evolución va ligada a la revolución tecnológica de las últimas décadas.

Hoy en día se ha consolidado como una herramienta de indudable utilidad en el quehacer diario de los Tribunales de Justicia, dando respuesta a los retos que se plantean desde el ámbito judicial. Desde la introducción de la huella genética en 1985 por Alec Jeffreys, ha habido una evolución continua en el tipo de marcadores y en las tecnologías utilizadas.

El descubrimiento de los ácidos nucleicos como medio de herencia y la dilucidación de la estructura de la molécula del ADN (ácido desoxirribonucleico) podrían considerarse como uno de los hallazgos científicos más importantes del siglo XX.

El primer polimorfo de ADN fue descrito en 1980. La utilización del estudio de polimorfismos de ADN en el campo forense vendría unos años más tarde gracias a la contribución de Alec Jeffreys y sus colaboradores en 1985, quienes, basados en los descubrimientos de una región repetitiva en el gen de la mioglobina, introdujeron el método conocido como, en español, “huella genética” o “huella de ADN”.

El análisis de ADN con fines forenses es una de las herramientas que ha revolucionado la investigación criminal desde hace más de 35 años y por lo tanto ha presentado significativos avances en torno a la resolución de casos complejos.

La criminalística se ha fortalecido significativamente en los últimos diez años, expandiéndose más allá de la medicina legal hacia campos como la bioquímica forense y la biología molecular, reflejando la importancia creciente de estas ciencias en el ámbito legal. La creación de laboratorios especializados se ha vuelto una prioridad en respuesta a las alarmantes tasas de casos en criminalística en México.

En México, el uso de la genética forense ha cobrado especial relevancia en el contexto de delitos de alto impacto, desapariciones y fenómenos criminales complejos que demandan respuestas científicas precisas para garantizar los derechos fundamentales y la correcta administración de justicia. No obstante, el empleo de esta técnica exige cumplir rigurosos estándares técnicos y jurídicos que aseguren su validez dentro del proceso penal.

La importancia de la genética forense no radica únicamente en su capacidad para identificar con exactitud a un individuo, sino en el respaldo estadístico que otorga a los dictámenes periciales, contribuyendo a dotar de certeza científica y jurídica las decisiones del tribunal. En ese sentido, se convierte en un elemento clave tanto para

esclarecer hechos delictivos como para salvaguardar los principios del debido proceso y la presunción de inocencia.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es un país que transita desde hace décadas por un contexto de violencia sistémica que afecta a la impartición de justicia y perpetúa la impunidad, además de agravar el sufrimiento de las familias y colectivos de buscadoras, debido a las dificultades para localizar e identificar a las personas desaparecidas. A este respecto, no se puede obviar que la crisis forense es un problema multifactorial que requiere una estrategia integral para comprender y abordar todas sus aristas (falta de infraestructuras, corrupción, personal no calificado, etc.).

En la criminalística, la Genética forense ha presentado grandes avances, por lo que se ha recurrido a ésta para la resolución de delitos, las ventajas que ofrece la tecnología de genómica más novedosas permiten esclarecer casos complejos donde los sistemas genéticos tradicionales pueden ser insuficientes.

La genética forense es fundamental en México para la identificación humana y la procuración de justicia. Resulta crucial frente a la crisis de desapariciones y fosas clandestinas, y apoya la resolución de crímenes mediante el análisis científico del ADN.

Los Servicios Periciales en México, han tenido un desarrollo y aceptación muy importante en las últimas décadas. Se han transformado los laboratorios, los equipos e instrumentos para participar en la investigación científica

Conceptualizando esta definición se puede establecer la importancia que presenta la genética forense al ser una herramienta que emplea tanto elementos de criminalística de campo como un área especializada de criminalística de laboratorio.

En campo se enfrenta al reto de procesar indicios biológicos, tal es el caso de la sangre, saliva (células epiteliales); líquido seminal (células espermáticas), elementos pilosos, dientes, restos de tejido humano y elementos biológicos traza; en este sentido es muy sustancial que el área de criminalística de campo tome en consideración dos puntos importantes: el lugar o superficie de depósito del material biológico y el tiempo de permanencia que tienen éstos sobre el sitio. Por el otro lado, el área de criminalística de laboratorio se establece como un espacio totalmente especializado con un laboratorio de genética que debe cumplir ciertos requisitos, manuales y normatividades aplicables para que los resultados obtenidos sean confiables; aquí el tema de recepción de los indicios en cadena de custodia y la valoración de su viabilidad biológica son los puntos medulares ya que depende de cómo se presenten los efectos tafonómicos a nivel macroscópico para que se vean reflejados a nivel molecular como efectos estocásticos.

En el presente trabajo, se recopila información sobre los avances de la Genética forense para la obtención de perfiles genéticos en México. Es importante mencionar

que a pesar de que las técnicas para recolectar, cuantificar y determinar un perfil genético son de alto costo, es necesario aplicarlas para poder resolver un crimen y así poder aplicar la justicia en la sociedad mexicana.

III. JUSTIFICACIÓN

La genética forense es una disciplina crucial en la ciencia forense ya que participa en la identificación de personas, ya sea en casos de desapariciones o en casos criminales, así como cuando ocurren desastres masivos. En los casos donde se encuentra una muestra biológica en un lugar de investigación forense y se desea conocer su identidad, se compara con una muestra de referencia (es decir, aquella cuya identidad se conoce), como el perfil genético de la víctima antes de su desaparición o de familiares en línea directa.

Si bien la genética forense se ha considerado el “estándar de oro” entre las periciales debido al soporte científico que la respalda y a que tiene un gran número de aplicaciones, es de relevancia enfatizar que en el marco de la crisis forense, su principal objetivo ha sido el reconocimiento humano para establecer relaciones biológicas de parentesco (paternidad, maternidad, hermandad, abuelidad, etc.) o el establecimiento de coincidencias para relacionar o vincular personas con indicios y/o lugares de los hechos, del hallazgo o de la investigación; así como para la identificación de personas sujetas a procedimiento penal en casos de delitos contra la libertad sexual, entre otros.

Debido a que el empleo de la genética forense en la identificación humana es un pilar fundamental en la investigación criminal, especialmente en contextos de alto impacto social como la desaparición de personas y la resolución de delitos violentos en México, la creciente crisis forense y el alto número de casos sin resolver han evidenciado la necesidad de fortalecer las herramientas científicas aplicadas a la justicia, por lo que en este trabajo de investigación se centra en acercar a los conocimientos esenciales sobre la genética aplicada en contextos judiciales, para la obtención de un perfil genético, abarcando dos áreas fundamentales: trabajo de campo y el trabajo de laboratorio; por lo que es necesario analizar los pasos que ocurren en el primero y que dan parte al trabajo en el segundo. En el campo, existe el reto de recolectar y preservar indicios biológicos, como sangre, saliva, líquido seminal, cabello, dientes y restos de tejido humano. Es crucial considerar el tipo de superficie donde se hallan los indicios y el tiempo de permanencia de estos, ya que pueden afectar su viabilidad para el análisis. En el laboratorio, se requiere un entorno especializado que cumpla con normativas y protocolos que garanticen la confiabilidad de los resultados, por lo que es de suma importancia analizar cada etapa que ocurren para la obtención de un perfil genético es relevante porque contribuye al conocimiento y al entendimiento de los procedimientos forenses, especialmente de los análisis genéticos dentro del marco legal.

IV. OBJETIVOS:

General:

- Recopilar información bibliográficamente sobre la metodología para la obtención de un perfil genético humano.

Específicos:

- Describir las técnicas de biología molecular empleadas en el laboratorio de genética forense para extraer el ADN en muestras biológicas
- Determinar los fundamentos de PCR
- Cuantificación del ADN
- Análisis en Electroforesis Capilar e interpretación

V. MARCO TEÓRICO

1. El ADN

El ácido desoxirribonucleico o ADN constituye el material genético de los organismos. Es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los genes están formados. Es por ello que supone la clave primera y última del código de la vida, las instrucciones de conformación de los seres vivos. Durante el siglo XX se comenzó a entender la naturaleza y contenido del material hereditario.

Los hechos y descubrimientos que llevaron a este conocimiento se pueden dividir en cuatro fases que se corresponden casi matemáticamente con los cuatro cuartos del siglo XX. Primero se estableció la base celular de la herencia, es decir, los cromosomas. Posteriormente se definió la base molecular de la herencia mediante la definición y descubrimiento de la doble hélice de ADN, después se conoció cómo es el flujo de información de la herencia, con el hallazgo de los mecanismos moleculares de la célula y su aplicación in vitro y por último, en el último cuarto del siglo pasado se descifraron, en primer lugar, genes y posteriormente, genomas completos. El primer borrador de la secuenciación completa del genoma humano se publicó en el año 2000, entregando a la ciencia la primera gran perspectiva global de la clave última e íntima del funcionamiento de los organismos vivos y en concreto, de la especie humana.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula que transporta información genética para el desarrollo y el funcionamiento de un organismo. El ADN está compuesto por dos cadenas complementarias que se enrollan entre sí y parecen una escalera de caracol; esa forma se conoce como doble hélice. Cada hebra tiene una estructura principal compuesta por grupos alternados de azúcar (desoxirribosa) y fosfato. Unida a cada azúcar hay una de cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) o timina (T). Las dos hebras se conectan por enlaces químicos entre las bases: enlaces de adenina con timina y enlaces de citosina con guanina. La

secuencia de las bases a lo largo de la estructura principal del ADN codifica información biológica, por ejemplo, las instrucciones para producir una proteína o molécula de ARN.

El ADN tiene una parte central con un azúcar y un fosfato, a la que se enlazan unas moléculas llamadas bases. La desoxirribosa se refiere al azúcar, y el nucleico es el ácido formado por el fosfato y la base nitrogenada. Estas bases pueden ser de 4 tipos: Adenina, citosina, timina y guanina, nombradas normalmente como A, C, T, G. Y el orden en que se combinen una después de la otra, es lo que codifica la información genética.

Finalmente, esta estructura se enrolla sobre sí misma, formando unidades compactas llamadas cromosomas, que organizan y protegen el material genético dentro del núcleo cuando lo hay. El ADN también tiene la capacidad de replicarse, es decir, puede crear copias idénticas de cada una de las cadenas de la doble hélice, permitiendo que la información genética se transmita de una generación de células a la siguiente durante la división celular. Este mecanismo asegura que cada nueva célula contenga una copia completa del ADN.

A nivel funcional se organiza en genes, que son piezas de ADN que generan características físicas específicas. Estas características no vienen directamente del propio ADN, sino de una molécula llamada ARN, formada a partir del ADN, y codifica una proteína. Esto es lo que se llama el dogma central de la biología molecular: en el ADN hay genes que generan ARNs mensajeros, y estos generan proteínas. Y esto es lo que da las diferentes características físicas que observamos en individuos, como el color de ojos, o la altura. También se ha visto que algunas veces estas instrucciones están almacenadas directamente en el ARN, sin necesidad de pasar a proteínas, como en el caso de los micro ARNs. Pero estos suelen ser una excepción.

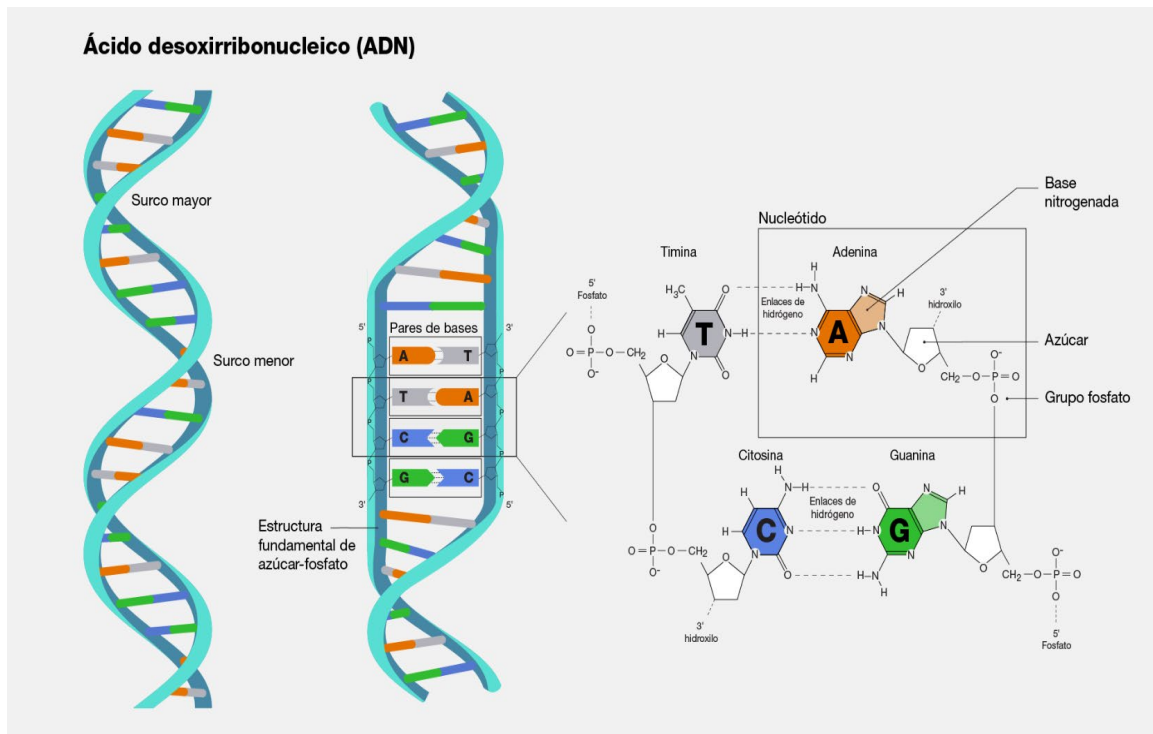


Figura 1. ADN

El ADN lo encontraremos en dos lugares dentro de cada célula: en mayor medida, en el núcleo de la célula (concretamente, en los cromosomas) y en una menor medida, en las mitocondrias.

De ahí los términos ADN nuclear y ADN mitocondrial, respectivamente. Aunque la mayoría de la secuencia de ADN es igual para todos los seres humanos, existe un pequeño porcentaje que varía, que nos hace poseer un ADN único y que nos diferencia del resto de personas. De hecho, es el ADN mitocondrial el que se transmite de madre a hijos prácticamente inmutable.

2. GENES, SECUENCIA CODIFICANTE Y SECUENCIA NO CODIFICANTE

El ADN está compuesto por genes, que incluyen secuencias codificantes y secuencias reguladoras. Un gen es un segmento de ADN que proporciona instrucciones para la síntesis de una proteína específica, una molécula que cumple una función en el organismo.

La genética es el estudio de los genes, los cuales son las unidades de información contenidas en la secuencia del ADN. Los seres humanos poseen aproximadamente 23 000 genes codificadores de proteínas. La ubicación de estos genes en el ADN es constante entre individuos y se conoce como locus. Para funcionar correctamente, un gen debe tener una secuencia de ADN muy específica. En

ocasiones, pequeñas diferencias en la secuencia de un gen pueden permitir que este siga funcionando, contribuyendo así a la variación genética entre individuos. Otras veces, la función del gen se ve más seriamente comprometida, lo que puede provocar enfermedades. Las diferentes formas de un mismo gen se denominan alelos. Los términos locus y alelo también pueden referirse, en general, a cualquier sitio específico del ADN cuya secuencia varía entre individuos. El término 'polimorfismo' expresa la variabilidad que existe dentro de un fragmento de ADN; en otras palabras, el número de alelos que hay en un locus. Como regla general, cuantos más alelos haya, mayor polimorfismo, y por ende, mejor identificación.

Dentro de un gen, la secuencia se divide en:

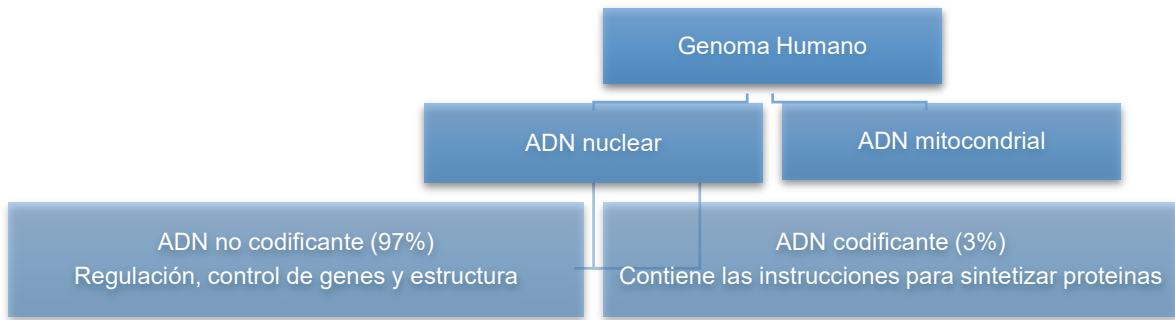
- Secuencias no codificantes
- Secuencias codificantes (conservado y variable)

Las secuencias no codificantes se denominaban antiguamente *ADN basura*, pero este término es erróneo. De hecho, se estima que entre el 25 % y el 80 % de las secuencias no codificantes actúan como ADN regulador esencial. Junto con el epigenoma (el conjunto de marcas y moléculas bioquímicas que existen en el ADN y a su alrededor), el ADN regulador controla cuándo, cuánto y en qué forma se produce una proteína a partir de un gen.

Las secuencias codificantes del ADN son leídas por la célula y utilizadas para sintetizar proteínas. Dentro del codificante, existe el ADN codificante conservado y variable.

El ADN codificante conservado son segmentos de nucleótidos que apenas han cambiado a lo largo de la evolución de las especies o entre individuos de una misma especie y su función es codificar proteínas esenciales, enzimas o ARN ribosómico que son indispensables para la vida y el desarrollo.

El ADN codificante variable son fragmentos del genoma donde la secuencia de bases nitrogenadas es muy diferente entre distintos individuos o poblaciones y su función es generar diversidad biológica y la variabilidad fenotípica (color de ojos, altura, etc.).



En términos generales se puede decir que el ADN es parecido entre los individuos de la especie humana en un 97%.

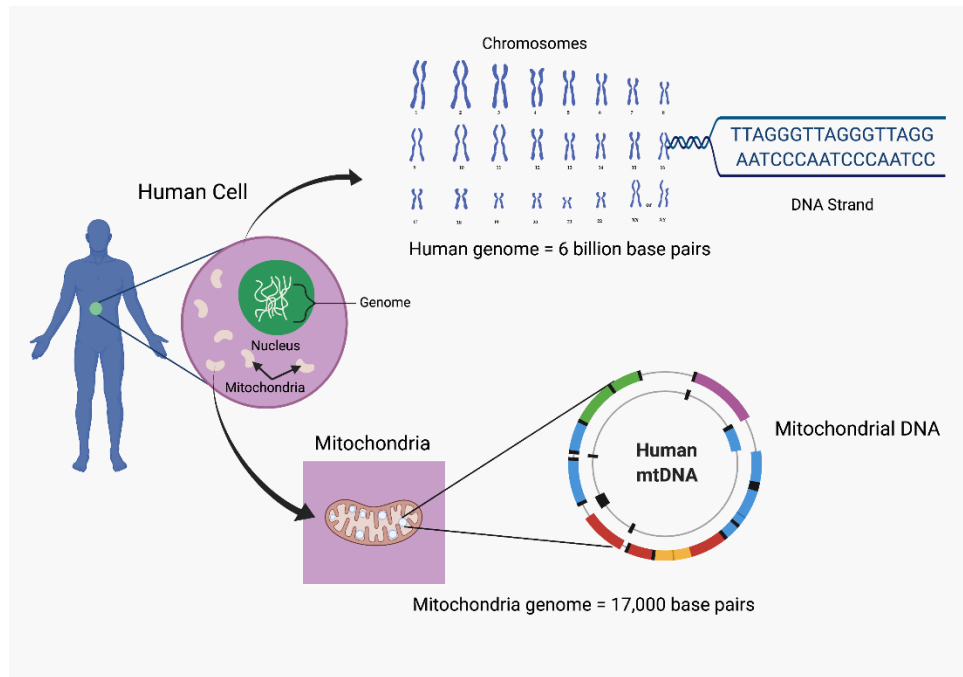


Figura 1

3. TIPOS DE REPETICIONES EN TANDEM

Dentro del ADN codificante variable existen repeticiones en tandem, que es una secuencia de dos o más bases de ADN que se repiten varias veces en forma de cadena en un cromosoma. En algunos casos, las repeticiones en tándem pueden servir como marcadores genéticos para rastrear la herencia en familias.

3.1 Repeticiones cortas en tándem o los STR (Short Tandem Repeats)

También conocidas como microsatélites, que son regiones que varían mucho de individuo a individuo. Estas regiones pequeñas son fáciles de amplificar y detectables por métodos convencionales de biología molecular. Algunas de estas secuencias de STR son las que se analizan para determinar relaciones de parentesco y equivalen al 3% del genoma humano. La posición donde se encuentran los STRs se llama locus (loci en plural) y son determinadas por el nombre de los marcadores que se usan.



3.2 Repeticiones en tándem de número variable (VNTR)

A veces denominados minisatélites y macrosatélites, los VNTR (repeticiones en tándem de número variable) son unidades de ADN que se repiten en tándem con un motivo de ≥ 7 pb. En la literatura sobre repeticiones en tándem, existen casos en los que los motivos de ≥ 100 pb se denominan macrosatélites. Sin embargo, este uso parece inconsistente y, según la definición anterior, seguirían considerándose VNTR.



Es importante señalar que estas definiciones se basan únicamente en el tamaño de la unidad repetitiva (o motivo). No tienen nada que ver con la cantidad de veces que se repite un motivo. Por ejemplo, una secuencia STR de tres pares de bases, como "ACG", que se repite en tándem 10 000 veces (para un total de 30 000 pares de bases), sigue clasificándose como una STR. De manera similar, un motivo de 50 bases que se repite solo tres veces (para un total de 150 pares de bases) se considera una VNTR, aunque sea mucho más corta que la secuencia del primer ejemplo.

4. EL ADN EN LA GENÉTICA FORENSE (LA HUELLA GENÉTICA)

La ciencia forense se construye a partir de casos y está orientada a la investigación; utiliza métodos científicos para estudiar trazas o vestigios de eventos pasados, como la presencia o actividades de individuos, a través de su detección, reconocimiento, recuperación, examinación e interpretación. Esta ciencia aplica conocimientos multidisciplinarios para investigar hechos presuntamente delictivos o situaciones de interés estatal. Un aporte crucial de la ciencia forense es la identifi-

cación de personas o cadáveres, entendiendo la identidad como el conjunto de signos que distinguen a un individuo de todos los demás, durante la vida o después de la muerte.

En sus inicios la identificación humana se llevaba a cabo mediante el uso de parámetros morfológicos y marcadores genéticos clásicos, provenientes de antígenos eritrocitarios como el antígeno D del sistema Rh, grupos sanguíneos AB0, Duffy, etc. Sin embargo, en 1985, el Dr. Alec Jeffreys logró la identificación mediante el ADN al obtener un patrón de bandas parecido a un código de barras al que denominó huella genética o huella digital del ADN (del inglés, DNA fingerprinting) teóricamente único e irrepetible.

El Dr. Alec Jeffreys y su equipo de la Universidad de Leicester estudiaban minisatélites, en busca de claves sobre la evolución de los genes causantes de enfermedades. Para comprender mejor la naturaleza de estas secuencias repetidas, llevaron a cabo el siguiente proceso:

- a) Trataron una muestra de ADN humano (que contenía minisatélites) con enzimas de restricción que cortan el ADN, obteniendo así fragmentos de longitud variable.
- b) Realizaron una técnica denominada electroforesis en gel, que permite separar los fragmentos de ADN (cargados negativamente) en base a su tamaño. Los fragmentos más cortos avanzan más rápidamente por el gel, pero los más largos (es decir, aquellos que contienen más repeticiones) avanzan más lentamente.
- c) Transfirieron el resultado de la electroforesis a una membrana en la que se realizó una hibridación con sondas marcadas para detectar minisatélites. El resultado obtenido fue un patrón de bandas, cada una de las cuales corresponde a un fragmento de ADN donde están los minisatélites analizados.

Posteriormente realizaron el mismo proceso con una muestra de ADN de otra persona, y obtuvieron un patrón de bandas completamente distinto. De esta forma, Jeffreys y su equipo dedujeron que el patrón de bandas era exclusivo de cada persona, y que, por tanto, era posible realizar una identificación precisa de individuos a través de su ADN. “Obtuvimos algo parecido a un código de barras exclusivo de cada persona”, explicaba Jeffreys en una entrevista un tiempo después. Al patrón de bandas único de cada persona lo denominaron Huella Genética.

A esta técnica se le denominó RFLPs (del inglés, restriction fragment length polymorphisms) por el uso de enzimas de restricción o MLPs (del inglés, multilocus probes) por emplear múltiples sondas para detectar varias secuencias del genoma.

Posteriormente, se utilizaron marcadores VNTRs (del inglés, variable number of tandem repeats) que como su nombre lo indica surgen de una repetición en tándem que se repite un número variable de veces, lo que ocasiona variabilidad en el tamaño del fragmento que se detecta. Aunque estos marcadores fueron ampliamente usados, al poco tiempo fueron sustituidos por las sondas de locus único (SLPs, single locus probes), debido a los problemas en la interpretación bioestadística y reproducibilidad de los MLPs. Una representación de las huellas genéticas obtenidas mediante MLPs o SLPs se muestra en la Figura 2.

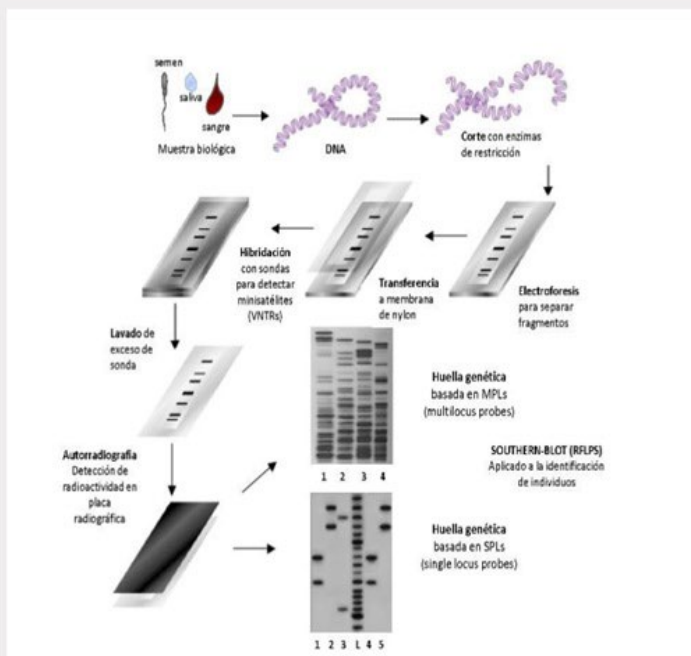


Figura 1

Análisis por Southern-blot (RFLPs) para analizar minisatélites con sondas multilocus (MLPs) o de locus único (SLPs) para generar huellas genéticas.

Figura 2

Sin embargo, estas técnicas de locus único cayeron rápidamente en el desuso por generar diversos inconvenientes en el trabajo de rutina de los laboratorios forenses, entre ellos:

- Requerían una gran cantidad muestra biológica para obtener ADN de alto peso molecular, lo cual no siempre es posible en situaciones en las que se analizan muestras provenientes de escenas del crimen.
- Requerían un gran esfuerzo analítico en días de trabajo y experiencia para obtener perfiles genéticos reproducibles.
- Por la extremada variabilidad de los patrones genéticos generados, se dificultaba establecer concordancias e interpretar la información generada.

El desarrollo en 1983 de la técnica de PCR (del inglés polimerase chain reaction) por el Dr. Kary Mullis, cambió el complicado panorama de ese entonces para obtener huellas genéticas, ya que esta técnica permitía que en poco tiempo y con poca cantidad de ADN molde se pudiesen amplificar o generar millones de copias de fragmentos de interés, de manera que amplificando marcadores como los VNTRs, seguido de una sencilla electroforesis y tinción posterior, se podían obtener genotipos variables con fines de identificación humana, criminalística y pruebas de filiación.

El siguiente paso importante fue el descubrimiento e implementación de secuencias variables de menor tamaño, particularmente los microsatélites o STRs (del inglés, short tandem repeats). Por su tamaño pequeño, los marcadores STRs se podían amplificar fácilmente ofreciendo mayor robustez y sensibilidad ya que permitían obtener resultados a partir de cantidades mínimas de ADN molde (0.5 a 1 ng), lo cual es crucial en investigaciones criminales y desastres masivos.

Los amplificados de PCR se detectaban por electroforesis tradicional en una superficie de soporte (gel), donde las muestras se separaban bajo la acción de un campo eléctrico según su carga, forma y peso molecular; los fragmentos más pequeños corren más rápido mientras los grandes migran más lento y se retrasan. Finalmente, se aplicaba una tinción para evidenciar los fragmentos de ADN en forma de bandas, y se utilizaba una escalera de alelos como referencia (en inglés, ladder) para determinar el genotipo de los individuos.

La identificación de individuos a través de la huella genética se ha ido sofisticando con el tiempo. En un primer momento se basaba en el análisis de minisatélites, y posteriormente se amplió a microsatélites, cuando estos se descubrieron. Además, a principios de los 90 esta técnica comenzó a combinarse con la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), lo que permitió amplificar las cantidades de ADN que se analiza, por lo hoy en día es posible identificar individuos usando restos mínimos de material biológico (se pueden identificar personas a partir de 150 células). Actualmente este método se denomina también perfil genético.

5. PERFIL GENÉTICO

Un perfil genético proporciona un mapa detallado de la composición genética única de cada individuo, ofreciendo información valiosa sobre sus predisposiciones y características biológicas.

Todos los humanos compartimos el 99.9% de nuestro ADN. Sin embargo, en el 0.1% restante existen características únicas, propias de cada individuo, que permiten su identificación de forma inequívoca. En algunas localizaciones de nuestro genoma existen unos determinados fragmentos de ADN de distinta longitud, que se repiten uno a continuación de otro o en tándem. El número de repeticiones de estos fragmentos contribuye a que el ADN de cada persona sea único y por tanto, diferenciable del de cualquier otro individuo (salvo en el caso de gemelos monocigóticos).

Estos fragmentos repetidos de ADN se denominan de una forma u otra en función de su tamaño:

- Los más pequeños (que oscilan entre 2 y 5 pares de bases) se denominan microsatélites o STR (por sus siglas inglesas Short Tandem Repeat).
- Los más grandes (que oscilan entre 6 y 25 pares de bases) se denominan minisatélites o VNTR (por sus siglas inglesas Variable Number of Tandem Repeats).

Tanto unos como otros, aparecen en más de mil localizaciones distintas dentro del genoma, generalmente en regiones no codificantes. Debido a que son diferentes en cada individuo y debido a su presencia en distintos puntos del genoma, los microsatélites y los minisatélites son utilizados como marcadores moleculares en varias técnicas del campo de la biología molecular y la genética, entre las que se encuentra la huella genética.

Para entender el origen y lo que significa un perfil genético, es necesario comprender las herramientas que ofrece el genoma para llevar a cabo la identificación humana, o sea lo que conocemos como los marcadores genéticos o moleculares, que son las partes del genoma que se analizan para llevar a cabo esta tarea.

Se denominan genéticos por su herencia mendeliana simple, y moleculares por localizarse en la molécula del ADN. Dichas secuencias se caracterizan por ser variables, es decir, polimórficas, lo que significa que en los cromosomas de una población la misma secuencia presenta al menos dos formas alternas o alelos, lo que eventualmente permitirá diferenciar cromosomas con alelos diferentes; por lo tanto, mientras más alelos tengan los marcadores, son más adecuados para estos fines. Cabe señalar que como organismos diploides, para cada secuencia del genoma humano una persona tiene dos alelos para cada locus, uno materno y otro paterno. Por tal motivo, los marcadores genéticos usados en identificación humana (con muchos alelos) generan un número aún mayor de genotipos que permiten hacer cada vez más único a cada individuo en una prueba de ADN.

En identificación humana se puede definir un marcador genético como un polimorfismo que permite diferenciar cromosomas e individuos, así como establecer sus relaciones biológicas de parentesco.

Los marcadores más empleados para realizar una prueba de ADN son los microsatélites, repeticiones cortas en tándem o STRs. Como su nombre lo dice, los STRs se componen de secuencias repetidas cortas (p. ejem. GATC) que dan lugar a diversos alelos que se nombran por el número de veces que se encuentre la secuencia repetida; por ejemplo, el alelo tres presentará tres veces la secuencia GATC (es decir, GATC, GATC, GATC), con la misma lógica para todos los alelos.

En la población podrían existir los alelos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, etc., y un número aún mayor de genotipos (por ejemplo, 6/6, 6/7, 6/9; 7/7, 7/9, 10/12, etc.).

Hay que señalar que la nomenclatura (rango de alelos) de cada STR puede ser diferente entre un marcador y otro. Cuando la persona presenta dos alelos diferentes se dice que es heterocigoto; mientras cuando tiene un solo alelo se asume que recibió el mismo alelo de ambos padres y se dice que es homocigoto (Figura 3).

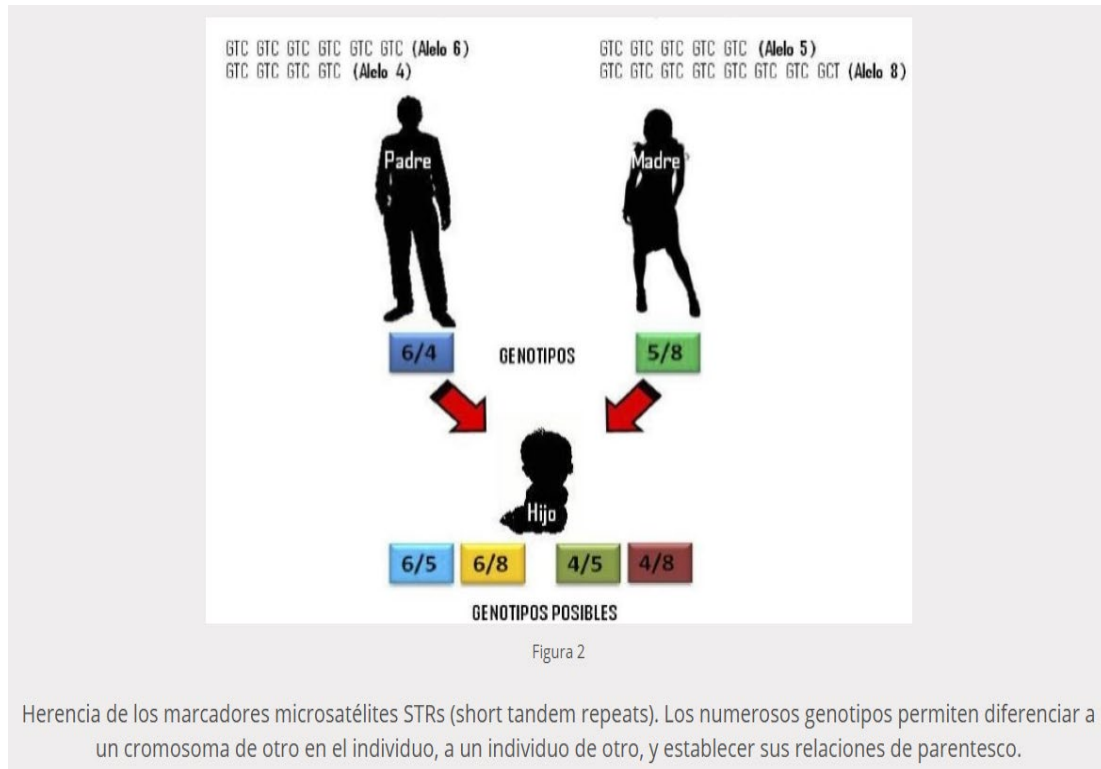


Figura 3

Se puede definir un perfil genético de ADN como el genotipo para varios STRs formando un código, el cual permite diferenciarlo o relacionarlo biológicamente con otras personas.

Por ejemplo, una pareja de heterocigotos para alelos diferentes puede tener hijos con cuatro genotipos distintos, lo que permite diferenciar individuos estrechamente relacionados como los hermanos, ya que la probabilidad de que dos hermanos tengan el mismo genotipo es sólo 0.25 (1/4). Esto significa que en una prueba de ADN estándar con 15 STRs la probabilidad de que dos hermanos compartan el mismo perfil es de $(0.25)^{15} = 9.3 \times 10^{-12}$, es decir aproximadamente uno en más de mil millones. Cabe mencionar las excepciones, en este caso los gemelos monocigotos que compartirían un mismo perfil de ADN.

6. MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos son regiones específicas del ADN que varían entre personas y se usan para identificar individuos en investigaciones legales.

Principales Tipos de Marcadores

6.1 Marcadores STR o Short Tandem Repeats

Los STR son secuencias cortas de ADN que se repiten varias veces dentro del genoma. Son los marcadores más utilizados en identificación forense, ya que presentan un alto nivel de variabilidad entre individuos. Estas repeticiones permiten generar perfiles genéticos únicos, lo que facilita comparar muestras biológicas en investigaciones criminales o en pruebas de parentesco.

6.2 Marcadores SNP o Single Nucleotide Polymorphisms

Los SNP corresponden a cambios en un solo nucleótido dentro del ADN. Aunque cada variación individual tiene menor poder discriminante que los STR, su abundancia en el genoma los convierte en herramientas valiosas para estudios genéticos a gran escala.

Se utilizan con frecuencia en: Investigación biomédica, estudios de evolución humana, identificación genética en poblaciones, etc.

6.3 Marcadores de ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial se transmite exclusivamente por vía materna, lo que lo convierte en una herramienta útil para estudiar linajes maternos y para analizar muestras biológicas degradadas.

Este tipo de marcador se emplea cuando el ADN nuclear no se encuentra en condiciones óptimas para el análisis.

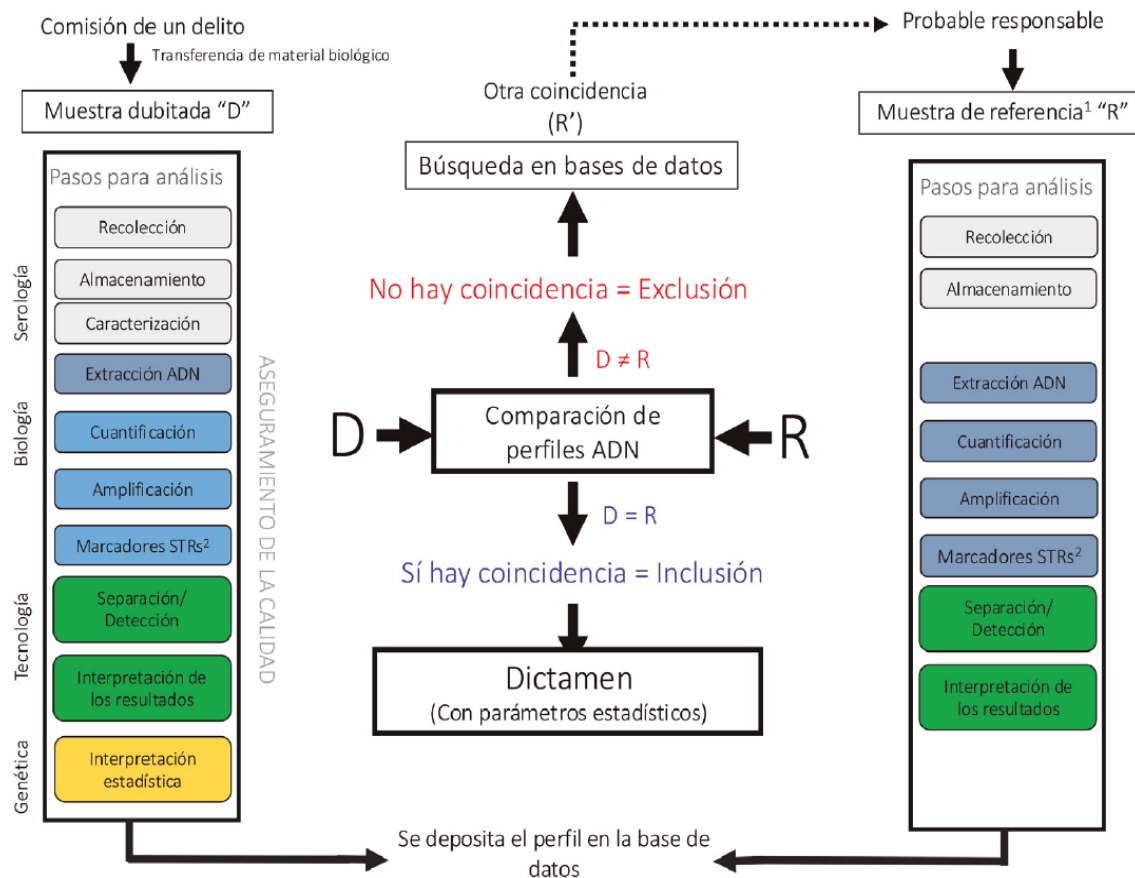
7. PROCEDIMIENTO PARA OBTENER PERFILES GENÉTICOS

Dentro de los tipos de indicio biológico que se pueden presentar en los diferentes escenarios o lugares de investigación se encuentran, entre otros, los siguientes:

- Sangre fresca o seca en materiales que puedan o no ser transportados.
- Saliva que contiene células epiteliales provenientes de la boca, por lo que al referirnos al análisis de la saliva nos referimos al análisis de las células epiteliales contenidas en ella y no al fluido como tal, contenida en soportes varios, como tazas, vasos, copas, colillas de cigarro, chicles o marcas de mordeduras, entre otros.
- Semen fresco o seco sobre soportes de tela o diversos materiales adsorbentes, así como en condones.

- Elementos pilosos (cabellos, vellos, cejas, barbas, bigote, entre otros) con o sin raíz.
- Dientes en diversos estados de preservación.
- Restos humanos, tejidos, huesos o restos esqueléticos en distintos grados de conservación.
- Elementos biológicos traza.

A continuación, se ilustra de manera general el procedimiento de los pasos que se deben realizar para trabajar las muestras biológicas y obtener un perfil genético de muestras dubitadas (D) o de referencia (R), así como los resultados posibles (una muestra dubitada es un indicio, evidencia o material de origen desconocido, cuestionado o cuya autenticidad no se ha establecido. Su nombre proviene del latín *dubitare* (dudar) y una muestra de referencia es aquellas de origen conocido y verificado, sirve como patrón de comparación para cotejarlas con la muestra dubitada).



Fuente: imagen modificada de *Steps involved in a Q-K comparison*. Butler, J.M. *Fundamentals of forensic typing*.

Del lado izquierdo se muestra el proceso que se sigue para las muestras dubitadas, las cuales pueden recuperarse como resultado de la transferencia de material

biológico durante la comisión de un delito y del lado derecho se muestra el proceso para las muestras de referencia, que pueden provenir de un probable responsable o en los casos de identificación de un familiar relacionado en línea directa. El proceso se divide en cuatro etapas: 1) Etapa de serología (gris): la recolección de una muestra dubitada (D) o de referencia (R); ésta se recolecta, traslada y es almacenada hasta que se lleva a cabo una caracterización de la misma para definir la naturaleza del indicio biológico, así como el estado de conservación en el que se encuentra. 2) Etapa biológica (azul): la extracción del material genético (ADN); el cual, en el caso de las muestras dubitadas, es cuantificado, amplificado y separado y en el caso de las muestras de referencia puede amplificarse directamente sin pasar al proceso de extracción y cuantificación. De manera particular, cuando la muestra se recolecta utilizando una tarjeta de papel autolítico, la amplificación se puede hacer directamente sin realizar una extracción previa. 3) Etapa de tecnología (verde): el análisis por electroforesis capilar. 4) Etapa genética (amarillo): se realiza la interpretación de los resultados y se calculan diversos parámetros estadísticos.

8. ETAPA 1: RECOLECCIÓN DE UNA MUESTRA DUBITADA O DE REFERENCIA (TRABAJO DE CAMPO)

Se considera muestra a todo vestigio biológico de un ser humano u otro ser vivo (en algún caso particular que amerite este punto) que pueda ser analizado por una técnica de laboratorio. En Genética Forense las muestras provienen con frecuencia de los individuos implicados en un delito, o de las personas que solicitan una prueba de paternidad. En criminalística, las muestras pueden obtenerse de la víctima de hechos delictivos, de los instrumentos usados, del autor del delito y del escenario del crimen.

Una muestra obtenida adecuadamente es importante porque puede llegar a ser una EVIDENCIA durante un proceso judicial, y una evidencia a su vez puede ser utilizada, en cualquiera de los siguientes casos: para demostrar la filiación entre varias personas, demostrar la relación de una muestra de una determinada persona con un delito y demostrar que los restos hallados corresponden a un determinado individuo.

Las muestras más frecuentes para obtener ADN provienen de la sangre fresca, la saliva, el semen, manchas de cualquier tipo con fluidos mixtos que contengan semen-sangre-células epiteliales, los tejidos cadavéricos (tejidos blandos, dientes y huesos largos), así como fluidos sobre soportes sólidos como papel filtro, hisopos, etcétera.

El proceso inicia con la recolección de una muestra dubitada (cuya identidad se desconoce), o una muestra de referencia (de identidad conocida, por ejemplo, aquella que proviene de un imputado o acusado o de un familiar relacionado en línea directa). La muestra es recolectada en el lugar de los hechos, del hallazgo o de la investigación; posteriormente, es trasladada al laboratorio, donde es

almacenada hasta su análisis o disposición final, considerando que una vez concluida la examinación debe volver a almacenarse.

La recolección de la muestra o indicio en el lugar de investigación forense es el primer paso del análisis genético. Se puede recuperar ADN de diferentes fuentes, por lo que el método de recolección debe realizarse con el objetivo de preservar la integridad de la muestra al trasladarla al laboratorio para su almacenamiento y análisis.

Algunas recomendaciones generales son:

- a) Evitar la contaminación del área, la cual podría presentarse como el dejado de cabello o huellas dactilares o de calzado del personal que esté procesando el lugar de investigación. Lo anterior se puede prevenir mediante el uso de medidas adecuadas de seguridad personal como bata, guantes, lentes de seguridad u overol industrial (Tyvek) y cubrebocas, así como evitar toser o estornudar cerca del área de investigación.
- b) Utilizar guantes para manejar los indicios y cambiarlos para manejar cada indicio.
- c) Empacar cada indicio por separado.
- d) Dejar secar las muestras de fluidos recogidas como la sangre o fluido seminal.
- e) Evitar utilizar bolsas de plástico para almacenar las muestras, dado que dentro de estas bolsas se condensa el agua lo que propicia la degradación del ADN.
- f) Las manchas secas de fluidos biológicos pueden ser tomadas con ayuda de un hisopo humedecido con agua destilada.

Es crucial mantener la cadena de custodia para garantizar que el indicio tomado es el mismo al que se le practicará análisis. Esto implica mantener un registro adecuado del personal que maneja las muestras y los análisis realizados. Las muestras de referencia son aquellas cuya identidad se conoce, como las de víctimas, acusados o familiares en casos de paternidad o personas desaparecidas. Suelen tomarse como sangre en un tubo o en forma de gotas sobre papel absorbente con químicos especiales que protegen el ADN (tarjetas FTA), hisopados bucales o cabellos arrancados

Las muestras deben de contenerse en materiales que no promuevan su transformación o alteración por humedad, calor y agentes como microorganismos (bacterias y/o hongos). De preferencia, embaladas en bolsas de papel estraza (a menos que el indicio se encuentre húmedo), ya que este material evita la condensación del agua, por lo que previene el desarrollo de microorganismos que pudieran degradar al indicio, si durante la recolección no es posible ponerlos a secar.

En el caso de las muestras biológicas, es importante que el traslado se realice en el menor tiempo posible y deseablemente utilizando una cadena de frío. Una vez que

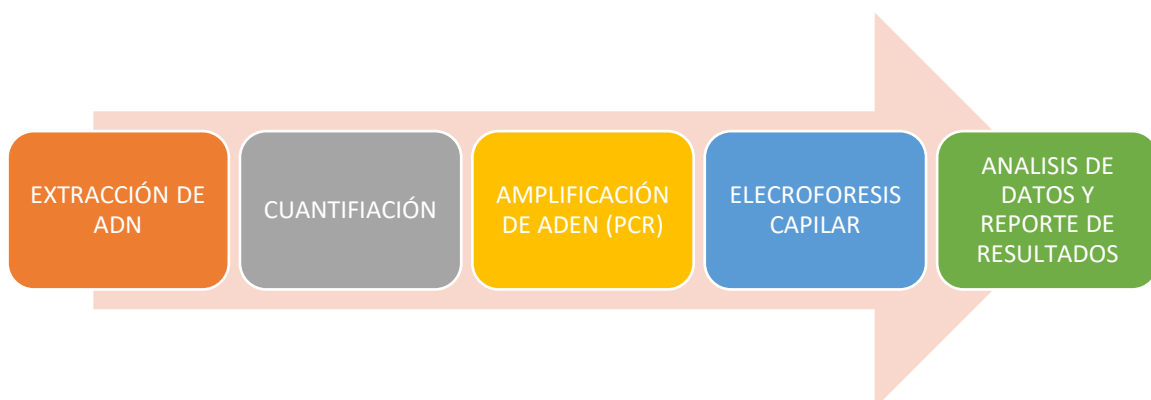
el indicio llega al laboratorio, éste debe almacenarse hasta el análisis. Es indispensable que, en cualquier bodega de almacenamiento se realice la correcta clasificación, acomodo y almacenamiento de los indicios, a fin de evitar confusiones posteriores, principalmente entre aquellos indicios procesados y no procesados. Se debe evaluar que los indicios se encuentren totalmente secos antes de almacenarlos, de lo contrario se deben secar a temperatura ambiente o mediante un desecador. Para indicios biológicos, las medidas de protección que deben ser consideradas durante el almacenamiento en bodega temporal o en bodega de indicios son:

- Conservar a temperatura ambiente.
- Mantener en un espacio ventilado.
- Evitar humedad y la exposición directa al sol.
- Si se tiene una muestra que, desde su hallazgo, se encontraba en condiciones que no favorecen la preservación del ADN, se debe dar prioridad a su análisis.
- Si se trata de tejidos blandos, se deberán refrigerar o congelar para prevenir su degradación

Una vez que se ha caracterizado una muestra o indicio y se ha establecido, mediante pruebas presuntivas y confirmatorias, que se trata de un fluido biológico del que es posible obtener ADN, el siguiente paso consiste en separar el material genético del resto de los componentes celulares, como proteínas, lípidos y azúcares.

9. ETAPA 2. PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN PERFIL GENETICO EN EL LABORATORIO DE GENETICA FORENSE

Los procedimientos empleados para recuperar el material genético dependerán de la naturaleza de los indicios. Una vez en el laboratorio se procede a lo siguiente:



9.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Un punto especial que se presenta en el contexto del análisis de la genética forense es el camino que recorren los indicios, una vez que se ha recolectado la muestra

biológica y se ha asegurado su almacenamiento en condiciones adecuadas, el siguiente paso consiste en extraer el ADN de la muestra. Este proceso permite separar y aislar el material genético de otros componentes celulares como ARN, carbohidratos, lípidos, enzimas y proteínas, facilitando su análisis posterior.

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos, es necesario previamente aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares. Consideramos que la extracción de ADN es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de los ácidos nucleicos.

Se han realizado análisis forenses con una concentración mínima de 1 nanogramo por microlitro de ADN y se han obtenido buenos resultados, pero debemos recordar que las muestras para los casos forenses son limitadas. Por lo tanto, todo procedimiento debe ser optimizado al máximo para alcanzar resultados más claros con escasas cantidades de material genético, ADN.

No se puede extraer igual cantidad de ADN de todos los tipos de muestras, esto varía notablemente entre unas y otras. A continuación, detallamos el contenido de ADN en diferentes muestras biológicas.

Tipo de muestra	Cantidad de ADN disponible
Sangre líquida	20 a 40 µg / mL
Manchas de sangre	250 a 500 ng / mL
Semen líquido	150 a 300 µg / mL (1-3 pg / célula)
Semen en frotis postcoital	10 a 3.000 ng / mL
Pelo con bulbo arrancado	1 a 750 ng / bulbo
Saliva	1 a 10 µg / mL
Frotis bucal	1 a 1,5 µg / mL
Orina	1 a 20 ng / mL
Huesos *	3 a 10 ng / mg de hueso
Fluido amniótico	65 ng / mL
Vellosidad corial	8 µg / mg
Hígado	15 µg / mg
Músculo	3 µg / mg

*Dependiendo de las condiciones

En general, todas las técnicas de biología molecular comienzan obteniendo el ADN molde, sin embargo, en genética forense se obtienen ADN de una infinidad de fuentes biológicas muchas veces no imaginadas, como chicle, manchas, pintalabios, una tasa, una botella con agua, un pasamontaña, restos calcinados, un rastrillo, cepillo de dientes, etc.

Las técnicas básicas utilizadas por el laboratorio de genética forense para obtener un perfil genético, se basa en la utilización de varios Kits, dependiendo de la muestra a tratar y su estado de descomposición, con el propósito de generar una lisis celular, es decir, la destrucción de las células, ya sea epiteliales (por ejemplo, mucosa oral en saliva, fluidos vaginales, leucocitos en sangre, etc.). cabe resaltar que este paso en muchos casos requiere un paso previo para obtener las células, de sangre separar los leucocitos (que si tienen ADN) de los eritrocitos (sin ADN); de osteocitos, descalcificar el hueso; de tejido desintegrarlo y homogeneizarlo, o realizar una lisis diferencial de células espermáticas.

A continuación, se describirán brevemente los kits más utilizados para en el laboratorio de genética forense.

9.2.1 Chelex 100

Es una resina quelante captadora de iones polivalentes que permite extraer el ADN a partir de diferentes sustratos de manera rápida y sencilla. Además, presenta la ventaja de poder extraer ADN a partir de muestras pequeñas puesto que, al ser el número de pasos reducido, la probabilidad de pérdida de ADN por manipulación es extremadamente baja.

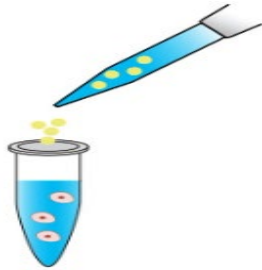
La resina Chelex 100 está diseñada para unirse fuertemente a iones metálicos divalentes como el Mg^{2+} , para la actividad de las metalonucleasas. La adición de la resina Chelex 100 inhibe eficazmente la actividad de las nucleasas en muestras complejas y las estabiliza para aplicaciones posteriores de PCR. Al mismo tiempo, la resina Chelex 100 elimina eficazmente los inhibidores de la PCR. Por lo tanto, la resina Chelex 100 puede utilizarse en lugar de costosos kits de extracción de ADN o ARN.

La resina Chelex 100 permite la preparación de ADN o ARN a partir de muestras complejas sin necesidad de kits de extracción. Un proceso rápido y sencillo de cuatro pasos suele ser suficiente para la preparación de ácidos nucleicos a partir de una amplia variedad de muestras. Si se requiere para la muestra o aplicación específica, se pueden combinar fácilmente reactivos adicionales con la resina Chelex 100.

Extracción

1. **Preparación.** Se prepara una suspensión de resina Chelex al 5% (generalmente en agua desionizada).
2. **Lisis.** Se coloca la muestra con contenido biológico (hisopo, tela, papel, etc.) en un tubo eppendorf y posteriormente se le adiciona la solución de Chelex 100, posteriormente se incuba a durante 1 hora en el hibridizador, para romper las células y libera el ADN.

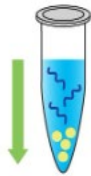
3. **Centrifugación.** Se centrifuga la muestra para que la resina Chelex (que es pesada) y los restos celulares se precipiten en el fondo del tubo.
4. **Recuperación.** El ADN de interés queda disuelto en el sobrenadante (la fase líquida superior) y está listo para ser utilizado como molde en reacciones de PCR.



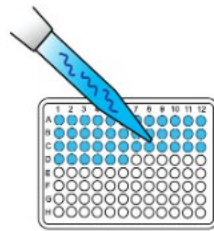
1. Se agrega la suspensión de Chelex 100 a la mezcla de muestra



2. Se calienta la muestra aproximadamente a 95°C de 2 a 10 minutos



3. Se separan las perlas de Chelex 100 de la muestra mediante centrifugación en el sistema de filtración.



4. Se utiliza el sobrenadante en pasos posteriores como la PCR.

enzimas nucleasas que degradarían el ADN y se eliminan inhibidores comunes de la PCR.

Lisis: Al hervir la muestra mezclada con Chelex al 5%, el pH alcalino y la temperatura rompen las células y liberan el ADN.

Ventajas

- **Rapidez y simplicidad:** Permite obtener ADN apto para PCR en apenas 15-30 minutos, sin necesidad de usar solventes orgánicos peligrosos.
- **Económico:** El costo por muestra es significativamente menor que el de los kits comerciales.

- **Seguridad:** Al no utilizar reactivos tóxicos (como fenol o cloroformo), es más seguro para el operador.
- **Minimiza transferencias:** Se realiza en un solo tubo, reduciendo el riesgo de pérdida de muestra o contaminación cruzada.

Desventajas

- **Pureza limitada:** El extracto final suele contener impurezas que pueden interferir o inhibir la amplificación por PCR si la muestra inicial no se trata adecuadamente.
- **Inadecuado para almacenamiento prolongado:** El ADN no se puede conservar por mucho tiempo ni congelar de manera indefinida, ya que sin un tampón estabilizador se degrada con mayor facilidad.
- **Muestra de cadena sencilla:** Las altas temperaturas alcalinas utilizadas para romper las células desnaturalizan el ADN, dejándolo de cadena sencilla (lo que puede afectar ciertas aplicaciones posteriores).
- **Poco eficiente en baja concentración:** No es el método ideal para muestras con cantidades minúsculas de ADN o muy degradadas, ya que el entorno agresivo podría destruirlas por completo.

9.2.2 Fenol-Cloroformo

La extracción de ADN con fenol-cloroformo es un método clásico de extracción orgánica que utiliza una mezcla de solventes para separar el ADN de proteínas y lípidos celulares. Tras la centrifugación, se forman dos fases: una **fase acuosa** (superior) que contiene el ADN purificado y una **fase orgánica** (inferior) con los restos celulares.

Fundamento de los reactivos

Fenol: Desnaturaliza (rompe) las proteínas y las separa del ADN.

Cloroformo: Ayuda a eliminar los lípidos, estabiliza la separación de fases y retiene el fenol en la fase orgánica.

Alcohol Isoamílico (mezcla PCI): Se añade frecuentemente (en proporción 25:24:1) para reducir la formación de espuma y evitar la formación de puentes entre fases, logrando una interfase más limpia.

Extracción

1. **Lisis celular:** Las células se rompen utilizando un tampón de lisis (con detergentes y enzimas como la proteinasa K) para liberar el ADN. Se coloca la muestra con contenido biológico (hisopo, tela, papel, etc.) en un tubo eppendorf y posteriormente se le adiciona 250 µL de Buffer de Digestión con

25 μ L de proteinasa K y 2.5 μ L de ditioneitol (DTT), posteriormente se incubaba durante 1 hora en el hibridizador.

2. **Extracción orgánica:** Se añade un volumen igual de mezcla Fenol-Cloroformo al lisado. Se agita (por inversión o vórtex) y se centrifuga.
3. **Recuperación del ADN:** Se transfiere cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo nuevo, evitando tocar la interfase blanca (donde se encuentran las proteínas desnaturalizadas).
4. **Precipitación:** Se añade alcohol (isopropanol o etanol absoluto) junto con sales para deshidratar el ADN, haciendo que precipite y forme un "pellet" (botón) visible tras centrifugar.
5. **Lavado:** El pellet se lava con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales.
6. **Re suspensión:** Se deja secar el etanol residual y el ADN purificado se re suspende en agua estéril o tampón TE.

Ventajas

- **Alta pureza:** Elimina eficazmente las proteínas y lípidos, resultando en un ADN de excelente calidad para su posterior análisis.
- **Mayor rendimiento:** Permite recuperar una mayor cantidad de ácidos nucleicos en comparación con otros métodos, lo cual es ideal para muestras difíciles o escasas.
- **Costo accesible:** Los reactivos utilizados son económicos y el proceso no requiere equipos costosos ni especializados.
- **Versatilidad:** Funciona con una amplia variedad de muestras biológicas (sangre, tejidos, plantas, etc.).

Desventajas

- **Alta toxicidad:** El fenol es corrosivo y el cloroformo es tóxico y volátil, por lo que su manipulación exige el uso obligatorio de campanas de extracción y equipo de protección.
- **Riesgo de contaminación:** El ADN queda en la fase acuosa superior y el mínimo error al pipetear puede arrastrar restos de fenol o proteínas de la interfase, lo que podría inhibir reacciones posteriores como la PCR.
- **Proceso laborioso:** Es un procedimiento manual que requiere mucho tiempo y múltiples pasos de agitación y centrifugación, lo que dificulta procesar grandes cantidades de muestras.

En la actualidad, muchos laboratorios complementan o reemplazan este protocolo con métodos comerciales más seguros y rápidos, como el uso de Columnas de Sílice o perlas magnéticas.

9.2.3 Differex

Differex es un sistema desarrollado por Promega diseñado para la extracción y separación diferencial de ADN en muestras de agresión sexual. Su método principal consiste en separar el ADN de los espermatozoides (fracción masculina) de las células epiteliales (fracción femenina) para obtener un perfil genético claro.

Este sistema se divide en el método de separación y el aislamiento posterior:

- **Separación de fracciones:** Utiliza la solución Differex Separation Solution para romper las células epiteliales primero, dejando intactos los espermatozoides, y separándolos mediante centrifugación y el uso del dispositivo magnético Differex Magnet.
- **Aislamiento del ADN:** La fracción separada pasa normalmente por un sistema de purificación (como el kit *DNA IQ*) para obtener ADN libre de inhibidores, listo para su amplificación y análisis.

El sistema Differex es un método sencillo y eficiente para separar el ADN epitelial y espermático, y reduce la variabilidad en los resultados entre diferentes examinadores, un problema común en otros métodos de extracción diferencial. Además, gracias al uso de la resina DNA IQ para sellar el sedimento, se reduce la pérdida de espermatozoides durante el proceso. La digestión con proteinasa K de la metodología estándar se mantiene para el procesamiento inicial del soporte sólido. El imán Differex tiene dos posiciones diferentes, ya que la posición y la forma del sedimento formado tras cada centrifugación varían ligeramente. La resina DNA IQ migra hacia el imán y sella el sedimento de espermatozoides. Los dos imanes separados permiten que la resina DNA IQ forme una mejor capa sobre los sedimentos.

El tiempo total para separar los espermatozoides de las células epiteliales tras añadir la muestra a la solución de digestión con proteinasa K es de aproximadamente 2 horas, incluyendo 90 minutos de digestión con proteinasa K.

La purificación del ADN requiere 30 minutos, por lo que la separación y purificación pueden completarse en tan solo 2.5 horas.



9.3 CUANTIFICACION Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Luego de la extracción se debe evaluar la cantidad y la calidad del ADN extraído. La cuantificación de ADN es un proceso crítico de laboratorio que mide la concentración (ng/μL) y evalúa la pureza de las muestras de material genético. Este paso es esencial para garantizar el éxito, la fiabilidad y la reproducibilidad de análisis posteriores como la PCR y secuenciación. La importancia de este proceso radica en que es muy importante tener una estimación de la cantidad de ADN para poder llevar a cabo satisfactoriamente el siguiente pasó, que es la amplificación por PCR. Esta estimación nos permitirá ajustar el volumen de ADN extraído que debemos añadir a la PCR para que ésta se desarrolle con éxito. Existen varios métodos para la cuantificación del ADN, entre los cuáles tenemos la PCR-TR utilizada en el laboratorio de genética.

9.3.1 PCR- TR (tiempo real)

La prueba se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) donde un fragmento de ADN conocido es copiado y amplificado billones de veces. El producto del PCR (punto final) es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra.

La PCR en tiempo real es una modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: “En tiempo real” esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción.

Los protocolos de la PCR en tiempo real pueden diseñarse para obtener resultados cuantitativos así como demostrar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN o ARN o resultados cuantitativos calculando el número de copias de ADN, que al compararse con una curva estándar, establece la cantidad de microorganismos

presentes en una muestra determinada o bien determinar el número de moléculas de un ARN para designar la expresión de este por ejemplo.

La gran ventaja de esta técnica es la flexibilidad en su diseño operativo ya que permite la detección cualitativa o cuantitativa del ácido nucleico dependiendo del propósito por lo cual la prueba es solicitada.

Una técnica altamente especializada que amplifica secuencias específicas de ADN.

- **Ventaja:** Es específica para ADN humano o dianas concretas.
- **Uso ideal:** Es el método estándar en aplicaciones forenses, ya que permite saber cuánto ADN amplificable está presente en la muestra.

Para entender el objetivo de este paso, hay que recordar que lo que sigue es la amplificación por PCR de los marcadores genéticos. La cuantificación por PCR en tiempo real consiste en amplificar la muestra de interés en presencia de muestras a diferentes concentraciones de ADN que sirven como referencia (0.5, 3, 5, 10, 20 ng/ μ L, etc). Los equipos de PCR tiempo real detectan con gran sensibilidad la amplificación de las muestras de referencias con relación a la muestra de interés. De manera que la PCR tiempo real en realidad no cuantifica la cantidad de ADN, sino la capacidad de la muestra de interés para ser amplificada. Con base en ello, se estima su concentración comparando con las muestras de referencia, lo cual prácticamente garantiza el éxito del siguiente proceso; la amplificación.

9.4 AMPLIFICACION DE ADN POR PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de biología molecular que permite replicar in vitro un segmento específico de ADN. Mediante ciclos térmicos, produce millones de copias de este fragmento, lo que facilita su análisis detallado para diagnósticos médicos, investigación forense o genética. Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento.

Podríamos decir que la técnica de la PCR permite seleccionar la región del genoma que se desea estudiar y realizar múltiples copias de la misma. Para ello, se prepara una reacción (mezcla de PCR o "mix") que contiene todos los elementos necesarios para producir una síntesis "in vitro" de ADN.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquáticus*, que es

capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura optima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN.

Componentes de la PCR:

- **Buffer de amplificación:** Los buffers de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa. La concentración óptima de MgCl₂ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.
- **ADN Molde o Templeate:** Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, es, por tanto, el ADN que la *Taq polimerasa* utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

Del marcador que se va a amplificar: hay marcadores cuyos primers son más específicos o bien cuyas condiciones de amplificación están mejor optimizadas que las de otros. Por esta razón puede darse el caso de que cierta cantidad de ADN (sobre todo cuando jugamos con cantidades mínimas) amplifique para unos marcadores pero no para otros. Por ello, cuando en un laboratorio se va a utilizar un nuevo marcador es necesario hacer un estudio de validación en él que se incluye un estudio de sensibilidad. De dicho estudio de sensibilidad puede sacarse como conclusión cuál es la mínima cantidad de ADN que amplifica en condiciones estándar. De manera general, para casi todos los STR utilizados en Genética Forense la cantidad óptima de ADN que asegura un rendimiento adecuado está en torno a los 5 ng.

Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a

amplificar haya sido dañado o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR. El problema de las cantidades mínimas de ADN y la presencia de contaminantes o inhibidores de la Taq es un hecho habitual en Criminalística y requiere un estudio pormenorizado de la muestra antes de la amplificación.

- **Cebadores (Primers):** Fragmentos cortos de ADN que delimitan el inicio y el fin del segmento exacto que se desea multiplicar. A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

La longitud de cada uno de los primers debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad.

Ambos primers deben tener una T_m similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C).

La relación bases púricas: bases pirimidínicas debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).

La secuencia de los primers debe comenzar y terminar con 1-2 bases púricas.

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

- **Enzima Polimerasa:** Generalmente la *Taq polimerasa*, una proteína termoestable que sobrevive al calor y se encarga de construir las nuevas cadenas de ADN. Las cantidades óptimas de Taq polimerasa necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 μl de volumen

final de reacción. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad. Por otro lado, pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50-60% con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la Taq. Por ejemplo concentraciones 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol

- **Nucleótidos (dNTPs):** Los "ladrillos" (A, T, C, G) que la polimerasa utiliza para formar la nueva cadena.
- **Cofactores:** Iones de magnesio para que la enzima funcione correctamente.
- **Adyuvantes de la PCR:** Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del DMSO y del glicerol, el adyuvante más extendido y utilizado es el BSA. A concentraciones por encima de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ el BSA incrementa la eficiencia de la PCR ya actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.

Proceso de Amplificación

El método automatizado se realiza en un equipo llamado **termociclador**, que controla los cambios drásticos de temperatura en tres fases fundamentales.

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

- DES NATURALIZACIÓN:** Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.
- HIBRIDACIÓN:** Esta fase se denomina también fase de "annealing" o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m , "melting temperature") depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los primers y la secuencia son

críticas en la designación de los parámetros de una amplificación. No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

- c) **EXTENSIÓN:** Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Un factor importante en el transcurso de las diferentes fases es el tiempo de rampa. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del aparato donde se realiza automáticamente este proceso, el termociclador. En las nuevas generaciones de termocicladores este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo.

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

Su capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es mínima o en casos en los que el ADN esté parcialmente degradado.

Genera en un espacio corto de tiempo un elevado número de copias de la secuencia de ADN que es objeto de estudio, lo cual permite utilizar técnicas de visualización más sencillas y rápidas que el uso de sondas marcadas radioactivamente.

Permite la determinación y agrupación alélica en clases discretas, lo que facilita la elaboración de bases de datos al ser la estandarización inmediata y posibilitar la aplicación de métodos bioestadísticos y programas elaborados.

El uso de marcadores microsatélites de pequeño peso molecular aumenta las probabilidades de obtener resultados positivos de amplificación cuando el ADN se encuentra degradado ya que puede ser que dichos fragmentos no hayan sido digeridos. Esta ventaja es de gran importancia en Criminalística ya que normalmente los indicios biológicos encontrados han estado sometidos a diversos factores (calor y humedad) que favorecen el crecimiento bacteriano.

Sin embargo, una de las grandes ventajas de la PCR que es su elevada sensibilidad puede, en ocasiones, convertirse en un gran problema ya que se podría coamplificar un ADN extraño o ajeno al que nos interesa. No obstante, en los laboratorios de Genética Forense las medidas de precaución que se toman para evitar problemas de contaminación por manipulación son extremas.

9.5 ELECTROFORESIS CAPILAR

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son separados en función de su tamaño por medio de un proceso de electroforesis.

La palabra “electroforesis” proviene del griego “electro” (electricidad) y “phoresis” (transporte o movimiento). Esta técnica fue desarrollada por primera vez en el siglo XIX y ha evolucionado considerablemente hasta convertirse en un pilar del análisis molecular moderno. El principio básico consiste en aplicar un campo eléctrico a una muestra que contiene moléculas cargadas (como fragmentos de ADN o proteínas), provocando su migración a través de una matriz de gel. Las moléculas más pequeñas y con mayor carga migran más rápidamente, mientras que las más grandes lo hacen con menor velocidad.

El ADN, debido a la presencia de grupos fosfato, tiene carga negativa, por lo que, dentro de un campo eléctrico, tenderá a moverse hacia el polo positivo o ánodo. Todos los fragmentos de ADN migrarán hacia el ánodo, pero los fragmentos más pequeños lo harán de manera más rápida que los de mayor tamaño. Existen diferentes métodos de electroforesis en función del medio en el que se lleve a cabo la separación. El más utilizado actualmente en Genética Forense es la electroforesis capilar.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica de separación que utiliza un campo eléctrico de alto voltaje para separar moléculas cargadas (como iones, proteínas o fragmentos de ADN) dentro de un tubo capilar muy fino. Ofrece una resolución excelente, alta velocidad y requiere volúmenes de muestra extremadamente pequeños.

Básicamente, la electroforesis es un proceso físico mediante el cual partículas cargadas migran a través de un determinado soporte cuando son sometidas a la fuerza de un campo eléctrico. La electroforesis capilar (normalmente representada por su acrónimo en inglés, CE) es un método alternativo para la separación de fragmentos y obtención de secuencias de ADN que suple, en parte, los inconvenientes de los sistemas convencionales. En este caso el soporte o medio de separación es un polímero incluido en un capilar de silica de unos 50 µm y de longitud variable lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores. La gran ventaja en cuanto a rapidez de la técnica se debe a que la preparación del gel y la carga de muestras se hacen de manera automática.

Por otro lado, se consigue una mayor sensibilidad, al poderse obtener resultados interpretables en los casos en los que el número de copias obtenidas por PCR es bastante bajo, y aumenta la capacidad para diferenciar alelos que se distinguen en un par de bases.

Además, los resultados obtenidos son analizados por un software evitándose así problemas de interpretación y permitiendo que éstos queden almacenados para posibles futuros análisis.

Para que pueda llevarse a cabo el análisis por electroforesis capilar es necesario que el ADN sea amplificado utilizando un par de primers o más (en el caso de los multiplex) marcados en el extremo 5' con unas moléculas llamadas fluorocromos los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda cuando son excitados por láser.

En el mercado existen diferentes tipos de analizadores genéticos para electroforesis capilar, uno de ellos es el ABI Prism® 310 de Applied Biosystem que es el que se muestra en la fotografía. Para agilizar los análisis, esta casa comercial ha desarrollado el mismo equipo pero con 4 capilares (Abi Prism® 3100-Avant).

La electroforesis constituye una técnica de separación basada en la diferente velocidad de los diversos solutos al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. La velocidad de las partículas depende de la carga de las mismas, la intensidad del campo eléctrico y del coeficiente de fricción de las moléculas con el medio.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión. El capilar en el que se lleva a cabo la electroforesis se encuentra cubierto por poliamida opaca excepto por una pequeña zona denominada “ventana del capilar” la cual es atravesada por el láser y permite que las muestras sean excitadas a su paso por la misma.

Estas emisiones de fluorescencia son recogidas en una parte del equipo denominada cámara CCD. Un software de recogida de datos define ciertas áreas en la cámara CCD para recoger exclusivamente las emisiones procedentes del grupo de fluorocromos que estemos utilizando. Por tanto, solamente se recogerán las emisiones de los fluorocromos con los que hemos marcado los primers de los fragmentos de ADN que queremos amplificar. Es posible utilizar más de un fluorocromo, lo cual es de gran utilidad en el caso de las PCR multiplex, sobre todo para evitar el solapamiento en aquellos marcadores de ADN que tengan tamaños similares. Por ejemplo, el marcador D8S1179 posee un rango de tamaños comprendido entre 128 y 168 pb mientras que en el D5S818 este rango oscila entre

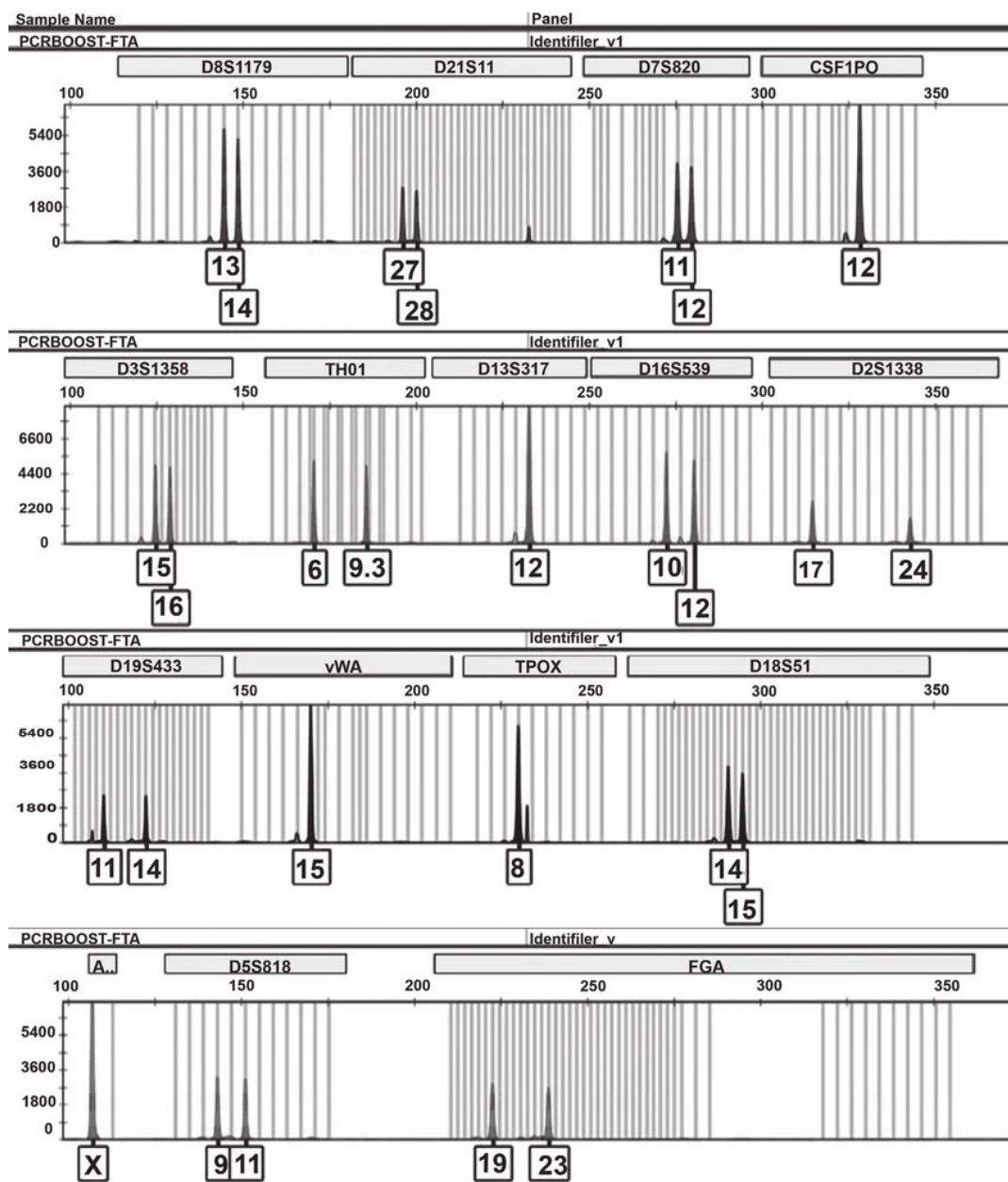
135 y 171 pb, por lo que habría un solapamiento entre los fragmentos comprendidos entre 135 y 168 pb.

De esta manera, cada marcador emitirá una fluorescencia a diferente longitud de onda y podrán diferenciarse aunque los fragmentos tengan tamaños solapantes.

Una vez recogidos estos datos de emisiones de los diferentes fluorocromos, éstos son enviados al ordenador el cual, a través de una serie de programas informáticos los transforma en secuencias de ADN o en fragmentos analizados con sus correspondientes alelos asignados. Este proceso se desarrolla aproximadamente en 40 minutos, tarda aproximadamente 30 minutos la corrida y 10 minutos en que el ordenador registre los datos.

Se utiliza un LADDER que es la referencia de todos los posibles marcadores genéticos, que hasta el momento a presentado la población, pero se utiliza en base al Kit que se este utilizando en la amplificación, IDENTIFILER, Y-FILER, PP16, PPY, MINIFILER etc. Esto depende mucho de la muestra, de la cantidad de ADN obtenido, su estado de degradación y si todavía hay o no arrastre de otro perfil, entre otros factores.

El perfil una vez obtenido se compara con el LADDER para confirmar los marcadores.



Electroferograma perfil genético utilizando el buffer PCRboost TM , mancha de sangre almacenada en tarjetas FTA TM .

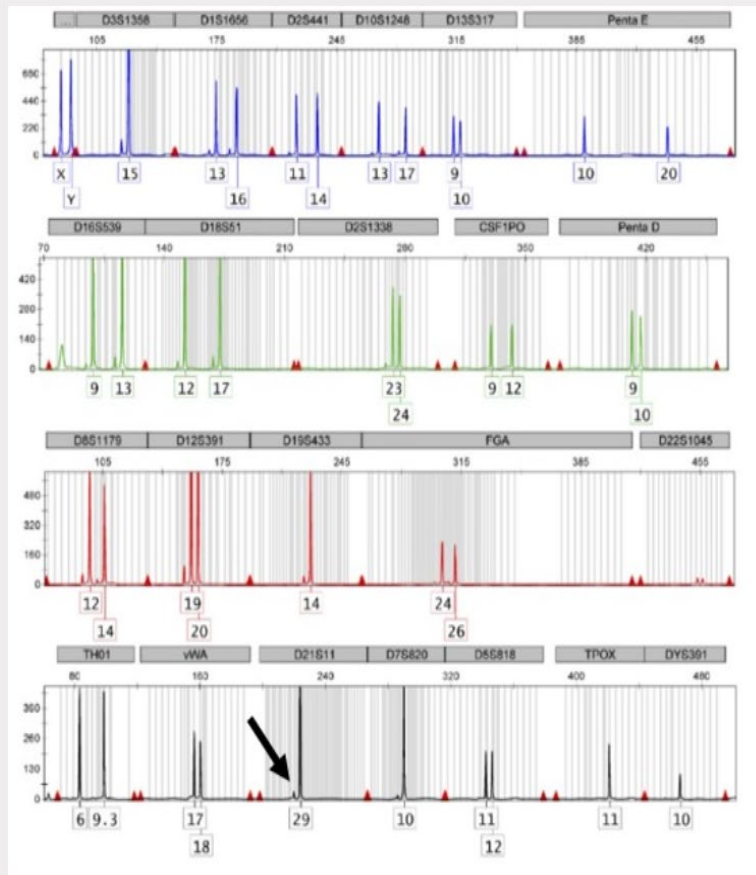


Figura 4

Perfil genético de un individuo. El tamaño (pb) de cada alelo (pico) y el STR que representa se muestra en la parte superior (gris). Debajo de cada pico se indican los alelos para cada STR. Para amelogenina se muestra el genotipo XY (varón). La medida del pico en RFUs se muestra en el eje de las Y. Se observa la presencia de algunos stutters (pequeños picos a la izquierda de algunos alelos), nótese el cercano al alelo 29 de D21S11, marcado con una flecha.

9.6 ELABORACIÓN DE DICTAMEN O INFORME PERICIAL

Como parte final del análisis e las muestras el perito profesional emite un documento con los resultados obtenidos, el cual se funda en indicios que relaciona detalladamente, así como las operaciones técnicas y metodológicas aplicadas, sus resultados y las conclusiones que de ella deriven.

VI. METODOLOGÍA

Durante la realización del servicio social, las actividades realizadas incluyeron trabajo de campo donde se recolectaron indicios biológicos, se resguardaban para realizar el trabajo en el laboratorio de genética forense donde se procesaban las muestras hasta obtener el perfil genético y posteriormente emitir un dictamen dirigido al ministerio público que solicitó dicho estudio. Las muestras biológicas que se utilizaron fueron propias de la Procuraduría General de Justicia del DF, por lo cual los datos de procedencia permanecieron anónimos.

El presente trabajo consiste en una investigación y recopilación documental, donde se realizando una búsqueda en libros de genética forense, artículos, publicaciones, etc., de donde se seleccionó, compilo y organizo la información existente sobre el proceso para obtener un perfil genético en el laboratorio de genética forense, con el propósito de tener un marco de conocimiento sobre el tema.

A continuación, se describirán las metodologías generales empleadas para la obtención de los diferentes perfiles genéticos a partir de diversas muestras biológicas trabajadas durante el servicio social.

A) Digestión y purificación con CHELEX 100

1. Se coloca una porción de la muestra biológica en un tubo eppendorf y se agrega perlas de Chelex 100 y 100 μL de agua.
2. Se deja durante 1hr. en el hibridizador, agitando regularmente.
3. Transcurrido el tiempo se agita con ayuda de un vortex durante 2 minutos.
4. Se colocan los tubos eppendorf en un porta viales y se colocan en agua hirviendo durante 8 minutos.
5. Transcurrido el tiempo se agita nuevamente la muestra con vortex y posteriormente se centrifugar 3 minutos a 14 000rpm
6. Se recupera el sobrenadante sin tocar las perlas.

B) Digestión y purificación con FENOL-CLOROFORMO

1. Se coloca una porción de la muestra biológica en un tubo eppendorf y agregan 250 μL buffer de digestión (B) con 25 μL de proteinasa K y 2.5 μL de DTT y se deja en el hibridizador por 1 h.
2. Se agrega un volumen similar al que tenemos de fenol-cloroformo, se agita con ayuda de un vortex durante 2 minutos y centrifugar 6 minutos a 15 000rpm.
3. Se recupera la fase acuosa y colocar dos volúmenes de alcohol absoluto.
4. Se mezcla por inmersión y centrifugar por 20 minutos a 16 000 rpm a 0°C.
5. Se decanta y se dejar en el termoblock hasta que se termine de evaporar el alcohol.
6. Por último, se recupera el residuo en un volumen 100 μL .

C) Digestión y purificación con S.V.

1. Se coloca la muestra en un tubo eppendorf y se añaden 100 μ L de agua y 250 μ L de buffer de lisis y posteriormente se deja 10 minutos en el hibridizador.
2. Transcurrido el tiempo se centrifuga la muestra durante 2 minutos a 16 000 rpm Se recuperar el sobrenadante y tirar el botón.
3. Se agregan 150 μ L de buffer azul, dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Se agita con ayuda de un vortex por dos minutos y se centrifugar 2 minutos a 16 000rpm
5. Se recupera el sobrenadante y se desecha el residuo.
6. Se agregan 200 μ L de etanol absoluto y colocar en la columna de silica, se centrifuga durante 2 minutos a 16 000rpm.
7. Se elimina el líquido y agregan 550 μ L de alcohol al 70 %, se centrifugar nuevamente durante 2 minutos a 16 000 rpm* (2 veces).
8. Se agregan 100 μ L de agua gota por gota y se centrifuga por 2 minutos a 16 000 rpm.

D) Cuantificación

- 1.- Se realiza una curva estándar, a diferentes concentraciones.
- 2.- Se hace una mezcla de 10.5 μ L primer con 12.5 μ L de la mezcla de reacción, por cada muestra.
- 3.- Se coloca 23 μ L de la mezcla en cada posillo de la placa, junto con 16 más para la curva (8 concentraciones de la curva aplicada doble vez).
- 4.- Se colocan 2 μ L de muestra, estándares y controles.
- 5.- Se coloca un plástico adherente a la placa y se pone en el aparato de PCR-TR.
- 6.- Se ajusta el aparato a las condiciones necesarias.

E) Amplificación

- 1.-Dispensar las cantidades indicadas en cada kit de primer y mezcla de reacción.
- 2- Según la cuantificación se agrega el volumen necesario para alcanzar una concentración de 1ng/ μ L.
- 3- Se ajusta al aparato dependiendo del sistema que se valla a utilizar.

F) Electroforesis Capilar

- 1.- Se realiza una mezcla de 1 μ L LIZ con 150 μ L Formamida, se coloca de la mezcla 12 μ L por cada poso.
- 2.- Se agrega 1 μ L del producto amplificado y al final se coloca 1 μ L del LADDER correspondiente al Kit utilizado, con mucho cuidado de no salpicar los demás posos y contaminarlos.

VII. CONCLUSION

El presente trabajo reunió de manera robusta la información necesaria para brindar un panorama general sobre el trabajo que se realiza dentro de la Fiscalía General de Justicia de la CDMX (anteriormente nombrada Procuraduría General de Justicia del DF) dentro del área pericial del genética Forense, citando las bases teóricas desde que inicia el proceso de recolección de muestra, siendo un paso importante ya que de su correcta realización nos da la certeza de poder obtener resultados de calidad y libres de contaminación de otros perfiles genéticos, sin dejar atrás la importancia del proceso que se realiza dentro del laboratorio de genética forense, donde cada día los avances han permitido que las muestras se trabajen de manera más certera, todo esto con la finalidad de poder dar respuesta a las solicitudes que ingresan dentro del área y así poder emitir un dictamen que nos con elementos técnicos-jurídicos sólidos, a través de bases científicas, colocando a esta área como una herramienta indispensable para la identificación humana.

La información recabada confirma que la genética forense constituye un pilar fundamental para la crisis de desapariciones que actualmente enfrenta el país, sin embargo, actualmente el laboratorio de genética forense sigue enfrentando varios retos, como son el hecho de trabajar con indicios biológicos que están en avanzado grado de descomposición y la extracción del ADN se ve comprometida para poder obtener un perfil genético que nos permita dar una respuesta más ágil, aunque la PCR nos permita amplificar cantidades pequeñas para poder trabajar, el trabajo que ingresa a diario y al poco personal que hay, se ve rebasado la capacidad de respuesta del laboratorio.

Por otro lado, el segundo reto es que se la creación de una base de datos a nivel nacional, que nos permita la comparación de perfiles genéticos de manera óptima y en menor tiempo para la identificación de personas desaparecidas o personas involucradas en algún delito, todo esto debido a la falta de coordinación entre las instituciones, que limita la eficacia y limita la posibilidad de almacenar información genética de la población que esta sin identificar, para futuras confrontas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Lourdes Prieto Solla.- Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados.- Memoria para optar al grado de doctorado.- UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Anthony J. F. Griffiths.-Genética.-Editorial MCGRAW-HILL/Interamericana de España, S.A.U. 7ª edición 2002

<http://www.criminalistica.com.mx/index.php/genetica-forense/1028-adn-con-fines-forenses>

Carmen Entrala Bernal.-ADN autosómico: microsatélites y su análisis.- Memorias curso en PGJDF.- México 2003

Merck KGaA1.-15939 Rojo nuclear sólido (C.I. 60760) Certistain®.- Darmstadt, Alemania 2004

<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen>

<https://genotipia.com/huella-genetica/>

<https://portal.amelica.org/ameli/journal/153/153759008/html/>

<https://www.pacb.com/blog/sequencing-101-tandem-repeats/>

Técnicas Instrumentales en Genética Forense | Fabricio González Andrade & Begoña Martínez Jarreta. <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/>

Hombreiro Noriega, L. (2013). El ADN de Locard: genética forense y criminalista: (ed.). Madrid, Spain: Editorial Reus. Recuperado de <https://elibro.uam.elogim.com/es/ereader/bidiuam/46532?page=41>.

Procuraduría General de Justicia de la Ciudad de México. 2019. Servicios Periciales. Coordinación General de Servicios Periciales. Recuperado el 21 de octubre de 2019, de Especialidades Periciales: www.pgj.cdmx.gob.mx/storage/app/media/especialidades.pdf