



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE DERECHO Y CIENCIA POLÍTICA  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE DERECHO Y CIENCIA  
POLÍTICA**

**TITULO DE TESIS**

**“Perfiles genéticos con ADN crítico en muestras biológicas”**

**para optar el Título de Especialista en Perito Forense con mención en Biología  
Forense.**

**Presentado por:**

**BACH.: ROSA VIRGINIA GUTIÉRREZ MÉNDEZ.**

**Asesor:**

**MG. MARIO JORGE MOLINA ADRIAZOLA**

**Lima – Perú**

**2019**

**Dedicatoria**

A Dios, por darme la vida y la sabiduría para conducirme por el camino correcto.

A mis padres, hermanos, sobrinos y amigos por el apoyo incondicional.

A Carlos por el cariño y respeto mostrado en todo momento.

## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que han colaborado en la realización del presente trabajo de investigación, ya que sin ellos no hubiera sido posible la elaboración y presentación del mismo.

En primer lugar, darle las gracias a todo el personal que integra la Sección de Biología y Genética Molecular del Departamento de Biología Forense, Laboratorio que pertenece a la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú; por haberme facilitado toda la información para la realización de la investigación, trabajo de relevancia en la sociedad científica en la era de la revolución genética.

En segundo lugar, mi más sincero agradecimiento a mis colaboradores, Crnel. S.PNP. Jorge Eduardo, HAU CAMORETTI, Crnel. S.PNP. Úrsula Alicia Zubiate López, Cmdte. S.PNP. Margot, HUAMÁN MENDIETA y Cmdte. S. PNP. Lizandrina, PÉREZ QUISPE, quienes me brindaron asesoramiento académico necesario para encaminarme en el tema.

Por último, a mis amigos que junto a mis seres queridos me brindaron todo su apoyo.

A todos ellos, muchas gracias.

## ÍNDICE

iv

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos .....	iii
Lista de tablas y figuras .....	viii
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT.....	x
Introducción .....	11
Capítulo 1: Planteamiento del Problema.....	13
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	13
1.2 Formulación del problema.....	18
1.2.1 Problema general. ....	18
1.2.2 Problemas específicos.....	18
1.3 Justificación e importancia de la investigación. ....	19
1.3.1 Justificación personal y profesional.....	19
1.3.2 Justificación institucional.....	19
1.3.3 Justificación académica. ....	20
1.3.4 Justificación social.....	22
1.3.5 Justificación académica. ....	24
1.3.6 Justificación legal.....	26
1.3.7 Importancia del estudio.....	27
1.4 Limitaciones del estudio. ....	28
1.4.1 Limitación teórica.....	28
1.4.2 Limitación práctica. ....	29

1.4.3 Limitación económica.....	29
1.5 Delimitación del estudio. ....	30
1.5.1 Delimitación espacial.....	30
1.5.2 Delimitación temporal. ....	30
1.5.3 Delimitación social. ....	30
1.6 Viabilidad del estudio. ....	31
Capítulo 2: Marco teórico. ....	32
2.1 Antecedentes. ....	32
2.1.1 Antecedentes Nacionales. ....	32
2.1.2 Antecedentes internacionales.....	34
2.2 Bases teóricas.....	39
2.2.1 La identificación genética humana. ....	39
2.2.2 El ADN. ....	42
2.2.3 Muestras biológicas. ....	55
2.2.4 El perfil genético.....	61
2.3 Marco conceptual.....	74
2.4 Objetivos e hipótesis. ....	77
2.4.1 Objetivos.....	77
2.4.2 Hipótesis. ....	78
Capítulo 3: Diseño Metodológico. ....	79
3.1 Tipo y diseño de investigación. ....	79
3.1.1 Tipo de investigación.....	79

3.1.2 Diseño de investigación. ....	80
3.2 Variables. ....	81
3.2.1 Variable independiente. ....	81
3.2.2 Variable dependiente. ....	81
3.3 Población, muestra y muestreo. ....	81
3.3.1 Población.....	81
3.3.2 Muestra. ....	82
3.3.3 Muestreo. ....	82
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos. ....	84
3.4.1 Técnicas de recolección de datos. ....	84
3.4.2 Instrumentos de recolección de datos. ....	85
3.5 Técnicas para el procesamiento de datos. ....	85
Capítulo 4: Análisis y discusión de resultados. ....	86
4.1 Análisis de resultados. ....	86
4.2 Discusión.....	92
Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones. ....	98
5.1 Conclusiones. ....	98
5.2 Recomendaciones. ....	99
Referencias Bibliográficas.....	100
ANEXOS .....	106
01 Matriz de consistencia.....	106
02 Instrumento .....	109

03 Protocolo de extracción y purificación de ADN crítico en muestras biológicas (Sugerido en base al Kit DNA IQ™ System-Promega Corporation) .....	111
04 Protocolo de extracción y purificación de ADN crítico en muestras biológicas (Sugerido en base al Kit PrepFiler Express™ Forensic y el equipo de extracción automatizado de ADN AutoMate Express Forensic - The Applied Biosystems) .....	112

Tabla 1. Perfil genético en distintas muestras biológicas forenses.....	.66
Tabla 2. Frecuencia de perfiles genéticos de las muestras biológicas en relación con la condición del ADN.....	91
Figura 1. Estructura de la molécula del ADN.....	44
Figura 2. Componentes de sangre.....	58
Figura 3. Short tandem repeats (STR´s) de 7 a 12 repeticiones .....	68
Figura 4. Herencia de los marcadores microsatélites STR´s (Short tandem repeats).....	70
Figura 5. Relación del perfil genético con el ADN crítico de las muestras biológicas. ....	86
Figura 6. Relación de la no amplificación del perfil genético con la ausencia del ADN crítico de las muestras biológicas. ....	87
Figura 7. Relación de la no amplificación del perfil genético con la escasez del ADN crítico de las muestras biológicas.....	88
Figura 8. Relación de la no amplificación del perfil genético con la inhibición del ADN crítico de las muestras biológicas. ....	89
Figura 9. Relación de la obtención del perfil genético parcial con la degradación del ADN crítico de las muestras biológicas.....	90



El presente trabajo de investigación titulado “Perfiles genéticos con ADN crítico en muestras biológicas”, tuvo como objetivo general determinar en qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas, el cual fue realizado en la ciudad de Lima, durante el año 2019, se tuvo una población total de 800 muestras biológicas con resultado positivo a la prueba de Bluestar® Forensic, remitidas a la Sección de Biología y Genética Molecular - DIRCRI.PNP durante los años 2008 al 2018, las mismas que procedieron de las distintas regiones que conforman el Perú, de las cuales se eligió en forma aleatoria 260 muestras para el presente estudio, los datos de interés se recopilaron por medio de una ficha de recolección de datos. Se analizaron las causas más comunes de la no amplificación del material genómico y la obtención de perfiles genéticos en forma parcial. Con la estimación de la ocurrencia de estos eventos se obtuvieron frecuencias absolutas con las cuales se determinó la existencia de la relación o no de las variables. De las 260 muestras analizadas, se determinó que solo en 50 de ellas se lograron obtener perfiles genéticos completos, mientras que en las 210 muestras restantes se hallaron características propias del ADN en condiciones críticas. En 170 de estas no se logró amplificar perfil genético alguno, atribuyéndoseles la ausencia de material genómico como causa de esta. Mientras que en 161 de las muestras la no amplificación fue debido a la escasez del ADN. Así como la presencia de inhibidores a la técnica del PCR fue el causante de la no amplificación en 163 muestras con ADN crítico.

La obtención de perfiles genéticos en forma parcial en 25 muestras biológicas analizadas fue debido a los índices de degradación que estas presentaban.

Palabras clave: Perfiles genéticos, ADN crítico, muestras biológicas.

The present research work entitled “Genetic profiles with critical DNA in biological samples”, had as a general objective to determine to what extent the genetic profile is related to the critical DNA of biological samples, which was carried out in the city In Lima, during the year 2019, there was a total population of 800 biological samples with a positive result to the Bluestar® Forensic test, sent to the Molecular Biology and Genetics Section - DIRCRI.PNP during the years 2008 to 2018, the same which came from the different regions that make up Peru, of which 260 samples were randomly chosen for this study, the data of interest were collected through a data collection form. The most common causes of non-amplification of genomic material and obtaining genetic profiles were partially analyzed. With the estimation of the occurrence of these events, absolute frequencies were obtained with which the existence of the relation or not of the variables was determined. Of the 260 samples analyzed, it was determined that only 50 of them were able to obtain complete genetic profiles, while in the remaining 210 samples DNA characteristics were found under critical conditions. In 170 of these it was not possible to amplify any genetic profile, attributing to them the absence of genomic material as the cause of this. While in 161 of the samples the non-amplification was due to the shortage of DNA. Just as the presence of inhibitors to the PCR technique was the cause of non-amplification in 163 samples with critical DNA.

Obtaining partial genetic profiles in 25 biological samples analyzed was due to the degradation rates they presented.

Keywords: Genetic profiles, critical DNA, biological samples.

## **Introducción**

La presente investigación tiene como finalidad determinar en qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico en las muestras biológicas remitidas a la Sección de Biología y Genética Molecular de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, durante los años 2008 al 2018. La escasa cantidad, la contaminación, la degradación del material genómico y/o la presencia de inhibidores de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), son algunas de las condiciones críticas encontradas en muestras biológicas que han sido modificadas (Mautner et al. 2017; Roewer 2013; Butler 2015; Maciejewska, Jakubowska, and Pawłowski 2013; Lorente 2004), estas características impiden la obtención de un perfil genético completo, necesario para la identificación plena de un individuo (Villalobos 2017). Establecer las frecuencias de dichas condiciones para considerarlas como las principales causas por las cuales no se logra identificar genéticamente a un individuo, permitirá el diseño de diversas estrategias a lo largo de las diferentes etapas del análisis genético que se siguen en la sección de Biología y Genética Molecular de la Policía Nacional del Perú.

En nuestro país no existe información sobre las estrategias a seguir, frente a las condiciones críticas en las que el ADN recuperado de este tipo de muestras se pueda presentar.

En ese sentido, se ha desarrollado la presente investigación, que se estructura de la siguiente manera:

El primer capítulo comprende el planteamiento del problema, dentro del cual se desarrolla la descripción de la realidad problemática, la formulación del problema, la justificación e importancia de la investigación, las limitaciones y viabilidad del estudio.

El segundo capítulo refiere sobre el marco teórico, desarrollándose los antecedentes de la investigación, las bases teóricas, el marco conceptual y los objetivos e hipótesis del estudio.

En el tercer capítulo, se desarrolla el diseño metodológico del estudio, que comprende el tipo y diseño de la investigación, las variables de la investigación, la población, muestra y muestreo utilizada para el enfoque desarrollado en el presente trabajo, así como las técnicas e instrumentos de recolección de datos y las técnicas para el procesamiento de datos.

En el cuarto capítulo se desarrolla el análisis y discusión de los resultados obtenidos.

Y finalmente en el quinto capítulo, se señalan las conclusiones y recomendaciones pertinentes al estudio.

## **Capítulo 1: Planteamiento del Problema.**

### **1.1 Descripción de la realidad problemática.**

En los últimos años, nuestro país viene experimentando un incremento alarmante en el número de denuncias por la comisión de diversos delitos, entre los cuales las modalidades más violentas son las que presentan mayores tasas. Razón por la cual establecer pruebas como posibles componentes para la resolución de éstos, se tornan sumamente importantes; no obstante llegar a la identificación humana a través de perfiles genéticos es el objetivo fundamental.

En el desarrollo de un hecho delictivo en la que los involucrados han intentado borrar los indicios resultantes de éste, generalmente se da la pérdida de los elementos que permiten desarrollar una teoría frente a lo suscitado.

Sin embargo, las víctimas de crímenes sangrientos y/o violentos no pueden desaparecer sin dejar un rastro. No importa cómo el asesino intente difícilmente limpiar y disponer el cuerpo, siempre existirá rastros que revelen lo suscitado.

Las partículas minúsculas de la sangre pueden aferrarse a la mayoría de las superficies por años, en casos extremos pasando desapercibidos por décadas.

Estos rastros de sangre se presentan sobre una amplia variedad de soportes, con características comunes de escasez, degradación y/o contaminación. Por lo que los investigadores recurren a pruebas de orientación altamente sensibles, como la del Bluestar, para poder ubicarlas y recolectarlas, con el fin de remitirlas al laboratorio

forense especializado donde se les practicarán otras pruebas de confirmación e individualización, como es el examen de análisis genético, con el propósito de extraer del núcleo celular el material genético (ADN) necesario para obtener el perfil genético que servirá para la identificación humana plena.

La Sección de Biología y Genética Molecular de la DIRCRI PNP es el único laboratorio especializado en la realización de exámenes genético moleculares, por ello recibe numerosas y diversas muestras biológicas de todo el territorio nacional; de esta diversidad de muestras, las que proceden de las inspecciones técnicas-científicas en las cuales se han empleado reactivos de alta sensibilidad como el Bluestar para orientar la presencia de restos sanguíneos son las que presentan mayor dificultad a la hora de ser procesadas, esto debido a la condición crítica en la que se encuentra el ADN presente en el núcleo de las células sanguíneas. A la presencia de la cantidad mínima de estas células en dichas muestras se suman la exposición a las condiciones medio ambientales e insumos químicos que empeoran la condición crítica del ADN en éstas muestras, es por ello que al final del procesamiento dentro del laboratorio se obtienen porcentajes mínimos de perfiles genéticos con el número adecuado de marcadores analizados que hagan considerarlos como perfiles genéticos completos, los cuales son necesarios para la identificación plena de la fuente humana que lo originó; mientras que la no obtención o la obtención de perfiles genéticos en forma parcial constituyen un mayor porcentaje, por lo que la identificación genética humana se hace muy dificultosa o en algunas ocasiones imposible.

La no obtención o la obtención parcial de un perfil genético en las muestras biológicas en estudio se deben principalmente a la ausencia, escasez o degradación del material genómico y/o a la presencia de inhibidores de la amplificación por la técnica de la PCR. Determinar la causa por la que se dan estos resultados son de suma importancia ya que nos permitirá aplicar diversas estrategias en los procedimientos según sea el caso para poder así llegar a la obtención del tan anhelado perfil genético.

Anteriormente, el uso de reactivos de orientación altamente sensibles, empeoraban la situación crítica del ADN en estas muestras latentes; hoy en día, el uso de estos reactivos no genera daño alguno sobre el material genético, aumentando las posibilidades de alcanzar la determinación de un perfil genético que identifique plenamente al individuo involucrado en el hecho investigado.

Así mismo, la aparición de nuevos kits de extracción, purificación y tipificación que recuperan cantidades ínfimas de ADN, que eliminan mayor cantidad de contaminantes y toleran la presencia de inhibidores que se encuentran presentes en dichas muestras biológicas, nos ayudan a superar enormemente la situación crítica en la que se encuentra el ADN analizado.

En el presente trabajo se ha podido determinar en qué medida la presencia del ADN en condiciones críticas en las muestras biológicas analizadas se relacionan con la obtención de un perfil genético parcial o la no obtención del mismo; datos que nos servirán para el planteamiento de diversas estrategias, todas ellas en busca de la mejora de los resultados obtenidos.

De no determinarse la relación existente y continuar con los procedimientos establecidos para la obtención de un perfil genético en estas muestras como si se trataran de cualquier otra muestra biológica forense, se continuará con el problema descrito; y no se podrá llegar a alcanzar el fin pretendido de la identificación humana a través de pruebas genéticas.

Si la ausencia de ADN en las muestras biológicas analizadas se relaciona estrechamente con la no amplificación de un perfil genético; nos mostraría la dificultad de la prueba de orientación utilizada para la detección de restos sanguíneos latentes en las superficies y/o soportes examinados ya que estarían generando falsos positivos o de lo contrario muestra la dificultad del operador en la interpretación adecuada de la prueba aplicada. Por lo que realizar estudios de sensibilidad y especificidad en el reactivo utilizado y brindar capacitación al personal encargado de la aplicación e interpretación del mismo constituirían medidas de control para superar la dificultad señalada.

Así mismo, si la presencia de ADN se encuentra en cantidades por debajo de los valores mínimos requeridos para la obtención de perfiles genéticos, nos muestra la relación que existe entre la escasez del ADN y la no determinación de un perfil genético; de encontrarse este problema el empleo de Kits comerciales en la etapa de extracción del ADN, con la capacidad de recuperar cantidades ínfimas de ADN en comparación con los métodos convencionales de extracción con fenol - cloroformo, constituirían una medida de control ante este inconveniente.



Mientras que si la degradación del ADN en las muestras biológicas analizadas es la causa por la que no se pueden tipificar la totalidad de marcadores genéticos analizados, obteniéndose solamente perfiles genéticos parciales la medida de control recaerá en el empleo de Kits de amplificación por la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la que los marcadores genético moleculares empleados presentan menores pesos moleculares haciendo posible obtener resultados en la mayor cantidad de ellos y por ende poder determinar un perfil genético con el que se puede individualizar a una persona.

Por el contrario, si la presencia de compuestos inhibidores de la amplificación por la técnica de la PCR están presentes en las muestras biológicas analizadas y éstas muestran una relación, el empleo de Kits de purificación del ADN constituyen la mejor medida de control; ya que aseguran la eliminación o la supresión de estos compuestos para garantizar el correcto proceso de amplificación de los fragmentos de ADN requeridos para la tipificación posterior, necesarios para la obtención de perfiles genéticos que permitan identificar a los individuos involucrados en los hechos investigados.

Es por ello que la Sección de Biología y Genética Molecular, del Departamento de Biología Forense de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, requiere la realización de estos estudios, para determinar las relaciones existentes entre la obtención de un perfil genético y las condiciones críticas del ADN en las muestras biológicas analizadas, para incorporar dentro de sus procedimientos tecnología de vanguardia que ayude a la resolución de los casos delictivos más complejos, a través de

la identificación humana con pruebas genético - moleculares, todo ello en bienestar de la sociedad como fin supremo y de coadyuvar con la administración de Justicia en nuestro país.

## **1.2 Formulación del problema.**

### **1.2.1 Problema general.**

¿En qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas?

### **1.2.2 Problemas específicos.**

1) ¿En qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la ausencia de ADN crítico en las muestras biológicas?

2) ¿En qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la escasez de ADN crítico en las muestras biológicas?

3) ¿En qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológicas?

4) ¿En qué medida el Perfil genético parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas?

### **1.3 Justificación e importancia de la investigación.**

#### **1.3.1 Justificación personal y profesional.**

El aporte en la resolución de un hecho delictivo, a través del uso de tecnología de vanguardia, como es el estudio de la molécula del ADN, es el objetivo primordial que todo profesional de las ciencias de la criminalística, especialmente del profesional involucrado en la genética forense, pretende alcanzar. Y más cuando el aporte proviene de muestras cuyas probabilidades de éxito son sumamente bajas debido a las características críticas que éstas presentan; debido a la escasez, al deterioro o a la inhibición del ADN, que minorizan las tasas de individualización genética que posteriormente servirán para la identificación plena de los individuos involucrados a través de la obtención de perfiles genéticos. Por lo que conocer en qué medida la obtención de perfiles genéticos se relaciona con el ADN crítico en las muestras biológicas me es un tema de suma importancia y constituye un reto para las ciencias criminalísticas.

#### **1.3.2 Justificación institucional.**

La Sección de Biología y Genética Molecular del Departamento de Biología Forense de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, es el área encargada de realizar los exámenes genéticos - moleculares en muestras biológicas remitidas de todo el territorio nacional. Durante su desempeño ha ido incorporado a sus procedimientos de laboratorio nuevas tecnologías de acuerdo al desarrollo de la ciencia de la genética forense. Ello ha involucrado la incorporación de kits comerciales para los diferentes procedimientos que involucran el análisis del ADN, como son la extracción, la

purificación, la amplificación y finalmente la tipificación del mismo; que complementan los métodos convencionales para los procedimientos descritos. Con el único propósito de optimizar los procedimientos de análisis del ADN en sus condiciones críticas, para la obtención de perfiles genéticos que permitan la identificación humana a partir de las muestras biológicas remitidas para dicho estudio. Por las razones señaladas es que se hace necesario estudios que nos permitan contar con datos que muestren los éxitos y/o fracasos en cada una de las etapas señaladas; y las dificultades que se presentan cuando se analiza ADN en sus condiciones más críticas, como son su escasez, su degradación y/o la presencia de inhibidores que dificultan e imposibilitan la obtención del tan apreciada identificación genética, siendo de suma importancia el estudio del tema señalado para la Sección de Biología y Genética Molecular para el cumplimiento de sus objetivos y el alcance de los fines que le permitan como institución del estado coadyuvar con la administración de justicia en nuestro país y estar al servicio de la sociedad.

### **1.3.3 Justificación académica.**

Entendiéndose a las Ciencias Forenses como una ciencia multidisciplinaria que involucra a la Biología, a la Medicina, a la Toxicología, entre otras ciencias fácticas y/o aplicadas como sus principales pilares para su desarrollo y las que permiten su existencia, es difícil encontrarla como parte de la currícula de cualquier carrera profesional en nuestro país. Sin embargo, cada una de estas ciencias toca en gran o mínima parte aspectos relacionados al tema forense.

Refiriéndonos específicamente a la Biología Forense, debemos señalar que ésta como tal no es infundida como parte de la formación profesional de los estudiantes de

pre grado que siguen la carrera de Biología o Ciencias Biológicas, en la mayoría de las universidades de nuestro país; salvo algunas que lo tienen como cursos electivos y/o como co-curriculares. No obstante, dentro de la educación de post grado podemos encontrar maestrías y/o especializaciones con denominada mención.

Pese a que el presente siglo es el denominado como la era del ADN, en nuestro país se observan falencias en cuanto al desarrollo de ramas involucradas en esta revolución científica. Por ende, es de suprema necesidad el impulso al desarrollo de investigaciones que involucren temas relacionados con la tecnología del ADN. Durante el desarrollo del presente trabajo se observó la tremenda necesidad de incorporar cursos de formación profesional en temas relacionados al campo forense ya que con el incremento de acciones delictivas en nuestro país se hace cada vez más necesaria la incorporación de profesionales especialistas en estos temas a las instituciones de apoyo del sistema jurídico.

El presente trabajo nos permitirá evaluar en qué medida se obtienen perfiles genéticos en muestras biológicas recolectadas posterior a la aplicación de pruebas sensibles de orientación, como es el Bluestar; además analizaremos las relaciones existentes entre la ausencia, la escasez, la degradación y/o la inhibición del ADN crítico en dichas muestras con la obtención de perfiles genéticos parciales y/o la no amplificación del mismo. La secuencia de pasos que engloba este procedimiento, permitirá al profesional del área desarrollar diversas habilidades. Desde el correcto manejo de las manchas latentes, el adecuado procedimiento que conlleva la aplicación del reactivo de alta sensibilidad, Bluestar, la diferenciación de las reacciones

quimiluminiscentes, el adecuado manejo de las muestras biológicas que serán estudiadas en los laboratorios de genética forense.

Una vez que dichas muestras lleguen al laboratorio, se emplearan diversas metodologías para la extracción y purificación de la más alta cantidad y calidad del ADN. Así mismo se aprenderá el manejo de la espectrofotometría y la PCR en tiempo real, metodologías usadas en la cuantificación. Las muestras biológicas que presenten características optimas, se procederá a la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la PCC multiplex, con los cuales se podrá realizar la electroforesis capilar, cuyos resultados serán analizados con softwares que permitan generar perfiles genéticos.

#### **1.3.4 Justificación social.**

Durante los últimos años el Perú viene experimentando un incremento alarmante en la tasa de denuncias por la comisión de diversos delitos (Comité Estadístico Interinstitucional de la Criminalidad 2018). Entre estos, los delitos contra la vida, el cuerpo y la salud, presentan en promedio un incremento del 2% cada año (Comité Estadístico Interinstitucional de la Criminalidad 2018). En el desarrollo de estos hechos delictivos los involucrados intentan borrar las evidencias biológicas modificando la escena (García 2008). Sin embargo, las víctimas de crímenes sangrientos y/o violentos no pueden desaparecer sin dejar un rastro (Arbeláez and Ríos 2009). Por lo que los investigadores de la escena del crimen emplean pruebas altamente sensibles que permiten identificar rastros de manchas que permanecieron latentes (Giraldo et al. 2013). No obstante, estas manchas presentan condiciones críticas que dificultan la identificación genética humana (Gill P et al. 2000). Determinar dichas causas nos permitirá elegir la

técnica de tipificación adecuada para garantizar la identificación plena de los involucrados.

En nuestro país no existen estudios que muestren datos exactos de la eficiencia y la efectividad de la respuesta del sistema de justicia penal, pero un estudio mundial muestra que la policía reacciona con prontitud ante los casos de homicidio, al grado que en poco más de 60% de éstos se halla en posibilidad de identificar y aprehender a uno o varios sospechosos en cada incidente, lo que permite que se lleve a cabo el proceso judicial. No obstante, se aprecian desigualdades regionales significativas: 80% y 85% de los homicidios, respectivamente, se “esclarecen” de esta manera en Asia y Europa, mientras que en América la proporción es de 50% (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito 2013).

El desarrollo del presente trabajo de investigación, nos va a permitir determinar las características cuantitativas y cualitativas del material genético obtenido de las manchas latentes de las escenas de crimen modificadas; y con estos datos se determinarán las principales causas por las que no se pueden llegar a identificar genéticamente a los individuos involucrados en estos hechos delictivos.

La identificación humana plena es un concepto que interesa conocer no sólo a la comunidad científica ligada a la genética forense sino también a la sociedad en general, pues de ésta dependerá muchas veces la justicia.

### **1.3.5 Justificación académica.**

Entendiéndose a las Ciencias Forenses como una ciencia multidisciplinaria que involucra a la Biología, a la Medicina, a la Toxicología, entre otras ciencias fácticas y/o aplicadas como sus principales pilares para su desarrollo y las que permiten su existencia, es difícil encontrarla como parte de la currícula de cualquier carrera profesional en nuestro país. Sin embargo, cada una de estas ciencias toca en gran o mínima parte aspectos relacionados al tema forense.

Refiriéndonos específicamente a la Biología Forense, debemos señalar que ésta como tal no es infundida como parte de la formación profesional de los estudiantes de pre grado que siguen la carrera de Biología o Ciencias Biológicas, en la mayoría de las universidades de nuestro país; salvo algunas que lo tienen como cursos electivos y/o como co-curriculares. No obstante, dentro de la educación de post grado podemos encontrar maestrías y/o especializaciones con denominada mención.

Pese a que el presente siglo es el denominado como la era del ADN, en nuestro país se observan falencias en cuanto al desarrollo de ramas involucradas en esta revolución científica. Por ende, es de suprema necesidad el impulso al desarrollo de investigaciones que involucren temas relacionados con la tecnología del ADN. Durante el desarrollo del presente trabajo se observó la tremenda necesidad de incorporar cursos de formación profesional en temas relacionados al campo forense ya que con el incremento de acciones delictivas en nuestro país se hace cada vez más necesaria la incorporación de profesionales especialistas en estos temas a las instituciones de apoyo del sistema jurídico.



El presente trabajo nos permitirá evaluar en qué medida se obtienen perfiles genéticos en muestras biológicas recolectadas posterior a la aplicación de pruebas sensibles de orientación, como es el Bluestar; además analizaremos las relaciones existentes entre la ausencia, la escasez, la degradación y/o la inhibición del ADN crítico en dichas muestras con la obtención de perfiles genéticos parciales y/o la no amplificación del mismo. La secuencia de pasos que engloba este procedimiento, permitirá al profesional del área desarrollar diversas habilidades. Desde el correcto manejo de las manchas latentes, el adecuado procedimiento que conlleva la aplicación del reactivo de alta sensibilidad, Bluestar, la diferenciación de las reacciones quimiluminiscentes, el adecuado manejo de las muestras biológicas que serán estudiadas en los laboratorios de genética forense.

Una vez que dichas muestras lleguen al laboratorio, se emplearán diversas metodologías para la extracción y purificación de la más alta cantidad y calidad del ADN. Así mismo se aprenderá el manejo de la espectrofotometría y la PCR en tiempo real, metodologías usadas en la cuantificación. Las muestras biológicas que presenten características óptimas, se procederá a la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la PCC multiplex, con los cuales se podrá realizar la electroforesis capilar, cuyos resultados serán analizados con softwares que permitan generar perfiles genéticos.

### **1.3.6 Justificación legal.**

Durante los últimos años el Perú viene experimentando un incremento alarmante en la tasa de denuncias por la comisión de diversos delitos (Comité Estadístico Interinstitucional de la Criminalidad 2018). Entre estos, los delitos contra la vida, el cuerpo y la salud, presentan en promedio un incremento del 2% cada año (Comité Estadístico Interinstitucional de la Criminalidad 2018). En el desarrollo de estos hechos delictivos los involucrados intentan borrar las evidencias biológicas modificando la escena (García 2008). Sin embargo, las víctimas de crímenes sangrientos y/o violentos no pueden desaparecer sin dejar un rastro (Arbeláez and Ríos 2009). Por lo que los investigadores de la escena del crimen emplean pruebas altamente sensibles que permiten identificar rastros de manchas que permanecieron latentes (Giraldo et al. 2013). No obstante, estas manchas presentan condiciones críticas que dificultan la identificación genética humana (Gill P et al. 2000). Determinar dichas causas nos permitirá elegir la técnica de tipificación adecuada para garantizar la identificación plena de los involucrados.

En nuestro país no existen estudios que muestren datos exactos de la eficiencia y la efectividad de la respuesta del sistema de justicia penal, pero un estudio mundial muestra que la policía reacciona con prontitud ante los casos de homicidio, al grado que en poco más de 60% de éstos se halla en posibilidad de identificar y aprehender a uno o varios sospechosos en cada incidente, lo que permite que se lleve a cabo el proceso judicial. No obstante, se aprecian desigualdades regionales significativas: 80% y 85% de los homicidios, respectivamente, se “esclarecen” de esta manera en Asia y Europa,

mientras que en América la proporción es de 50% (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito 2013).

El desarrollo del presente trabajo de investigación, nos va a permitir determinar las características cuantitativas y cualitativas del material genético obtenido de las manchas latentes de las escenas de crimen modificadas; y con estos datos se determinarán las principales causas por las que no se pueden llegar a identificar genéticamente a los individuos involucrados en estos hechos delictivos.

La identificación humana plena es un concepto que interesa conocer no sólo a la comunidad científica ligada a la genética forense sino también servirá como prueba en el desarrollo de la investigación de un hecho delictivo, el cual servirá para la correcta administración de Justicia.

### **1.3.7 Importancia del estudio.**

La importancia de la presente investigación radica en determinar en qué medida la condición crítica del ADN se relaciona con la determinación de un perfil genético, el cual es muy importante ya que con él se podrá identificar genéticamente al aportante del material biológico encontrado en el lugar donde se suscitaron los hechos que son investigados. Principalmente en las muestras biológicas que fueron modificadas con el único fin de borrar los indicios que surgieron en el desarrollo del hecho delictivo. Al conocer las relaciones existentes de las variables de estudio, el investigador podrá seguir las diferentes estrategias que garanticen la obtención de un perfil genético completo, el

cual es necesario para la identificación genética humana, y con ello el esclarecimiento de lo suscitado.

En ese sentido, a sabiendas de que gran parte de las muestras biológicas con resultado positivo a reactivos de alta sensibilidad, como el Bluestar, presentan condiciones de escasez, degradación y/o contaminación del material genético y/o contienen inhibidores de la técnica de amplificación por PCR; que dificultan los exámenes en el laboratorio, es preciso establecer la relación entre estas características y la obtención de resultados útiles para la identificación genética de la víctima (s) y/o sospechoso (s). Por ello, si se conociera en qué medida se relacionan estas características, el perito biólogo forense, será capaz de emplear las diversas estrategias diseñadas para este tipo de muestras biológicas, todo ello, con el único fin de coadyuvar a la administración de Justicia en nuestro país.

#### **1.4 Limitaciones del estudio.**

##### **1.4.1 Limitación teórica.**

Se han establecido como limitantes teóricas, la falta de estudios previos de investigación sobre la relación existente de las características críticas de la molécula de ADN presentes en muestras biológicas recolectadas mediante el empleo de reactivos de orientación de alta sensibilidad y la obtención de perfiles genéticos óptimos y/o parciales en muestras biológicas incriminadas en hechos delictivos.

#### **1.4.2 Limitación práctica.**

Conocer además de la determinación de perfiles genéticos en las muestras con pruebas de quimio luminiscencia positiva (Bluestar) remitidos a la Sección de Biología y Genética Molecular de la DIRCRI-PNP durante el periodo del 2008-2018, sería útil el establecer las causas por las cuales se obtienen perfiles incompletos o la ausencia de alelos caracterizados; iniciando desde la preparación de los reactivos que se utilizan en las pruebas altamente sensibles que ayudan a la orientación de restos sanguíneos que en la actualidad y en nuestro medio se vienen utilizando, la aplicación de éstos en los indicios latentes estudiados, la lectura del resultado a estas pruebas, el embalaje y envío de las muestras recolectadas a los laboratorios especializados. La utilización de equipos y reactivos, que permitan analizar material genético en cantidades mínimas de concentración, en estado de degradación o en presencia de inhibidores. Pero todos estos aspectos que involucran un estudio experimental no pueden ser incluidos en el presente trabajo, debido a que no se cuentan con todos estos materiales y/o equipos.

#### **1.4.3 Limitación económica.**

Debido a la carencia a la carencia de un presupuesto económico que solvete la parte experimental del estudio, se ha optado por la realización de un trabajo descriptivo, dentro de esta limitación también se vio por conveniente mencionar las limitaciones en tiempo disponible para la realización de los mencionados ensayos, entre otras razones; las cuales inspiran en iniciar el estudio conociendo la dinámica de trabajo en el Laboratorio en referencia a las solicitudes que se atienden y las características de las muestras forenses que llegan a estas instalaciones con el fin de identificar a un individuo;

con el tesón de seguir profundizando peldaño a peldaño el enigma que engloba la identificación genética de un individuo a partir de minúsculos rastros dejados en la escena de un hecho criminal los cuales fueron hallados con aplicación de pruebas sensibles de orientación.

## **1.5 Delimitación del estudio.**

### **1.5.1 Delimitación espacial.**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Sección de Biología y Genética Molecular, laboratorio que es parte de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, trabajo de investigación en el cual se revisaron y analizaron los perfiles genéticos obtenidos de las muestras con pruebas sensibles de orientación (Bluestar) que resultaron positivas las cuales fueron remitidas a la Sección del nivel nacional.

### **1.5.2 Delimitación temporal.**

En el desarrollo del trabajo de investigación se revisaron y analizaron los Dictámenes e Informes Periciales evacuados durante el periodo 2008 al 2018 por la Sección de Biología y Genética Molecular - DIRCRI PNP, los cuales plasman el resultado obtenido de los exámenes genéticos moleculares practicados a las muestras con pruebas sensibles de orientación (Bluestar) que resultaron positivas a éstas.

### **1.5.3 Delimitación social.**

El desarrollo del presente trabajo de investigación, plasmará la problemática que actualmente aqueja a nuestro país, al conocer la determinación de perfiles genéticos de

muestras forenses obtenidas por pruebas de orientación sumamente sensibles, la frecuencia con la que se hace esta determinación, la existencia de diferencia entre en el uso de del reactivo de alta sensibilidad, el soporte, el método de extracción y en kit de amplificación y mencionar las causas por las cuales no se pueden obtener perfil alguno, con el objetivo de la identificación humana plena es un concepto que interesa conocer no sólo a la comunidad científica ligada a la genética forense sino también a la sociedad en general, pues de ésta dependerá muchas veces la justicia.

### **1.6 Viabilidad del estudio.**

El trabajo de investigación, se llevará a cabo en las instalaciones de la Sección de Biología y Genética Molecular de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, institución que nos facilitará los archivos documentarios para la revisión de los escritos con los cuales se han solicitado las pruebas genéticas y los Dictámenes e informes Periciales que plasman los resultados obtenidos del estudio de las muestras forense remitidas. La revisión documentaria será llevada a cabo sólo por la autora de la investigación, los gastos económicos que conlleven el presente trabajo serán asumidas por la misma, se dispondrá de un tiempo prudente para la revisión documentaria, el análisis del mismo y la elaboración del informe final con la metodología planteada en cumplimiento a los objetivos trazados al inicio de éste.

## Capítulo 2: Marco teórico.

### 2.1 Antecedentes.

#### 2.1.1 Antecedentes Nacionales.

✓ (García 2008) en su trabajo de investigación titulado: “Manchas de sangre”, menciona que:

El espectacular avance en la tecnología de la investigación del ADN, pues éste ha supuesto un cambio radical en el estudio de indicios criminalísticos. Sin embargo, el éxito de la investigación depende en gran medida de las técnicas que permiten la detección y el estudio previo de la muestra; en su trabajo estudia la finalidad de estas pruebas sobre muestras contaminadas en el laboratorio con distintos productos y utilizando diferentes reactivos de orientación, como consecuencia de la contaminación se obtienen falsos resultados, tanto positivos como negativos, comprobándose que el reactivo más fiable es el Luminol, en una experiencia complementaria se comprueba la eficacia del reactivo sobre muestras lavadas.

En forma semejante a nuestro trabajo, la investigación señalada en la referencia, tuvo como finalidad demostrar que el uso de reactivos de orientación de alta sensibilidad, no causan ninguna alteración en el ADN de las muestras biológicas estudiadas. Y que a partir del ADN crítico presente en dichas muestras se pueden obtener perfiles genéticos. Por lo que la aplicación del reactivo químico luminiscente, Bluestar, influenciará en los resultados que podamos obtener en nuestro estudio, por lo que llegar al objetivo de



determinar en qué medida la obtención de perfiles genéticos se relaciona con la existencia del ADN crítico en muestras analizadas podrá ser posible.

✓ (Talledo et al. 2010), en su investigación titulada “Comparación de la distribución alélica de 16 loci STR entre la población andina y costera de Perú”, analiza:

La distribución alélica de 16 marcadores moleculares tipo STR`s en individuos no relacionados en siete diferentes ciudades peruanas, tres ciudades del altiplano andino y cuatro costeras. Determinando la frecuencia de los alelos, los parámetros estadísticos, el equilibrio Hardy-Weinberg y para compararla entre ambas poblaciones. La probabilidad de casación combinada para los 16 loci fue  $5,41136 \times 10^{-15}$  y la probabilidad combinada de exclusión (PE) fue 0,999998307. Los resultados mostraron nuevas bases de datos locales para la evaluación de las poblaciones andinas y costeras del Perú en las pruebas de la identidad humana.

Si bien es cierto que los objetivos seguidos en este estudio no se asemejan a los nuestros, en el desarrollo de este se menciona la importancia de las características óptimas que deben de tener las moléculas de ADN para obtener perfiles genéticos completos, los cuales van a permitir la elaboración de bases de datos poblacionales muy útiles en la identificación humana.

Así como el trabajo antecedido existen varios investigadores de nuestra localidad que han llevado a cabo estudios de muestras biológicas con características óptimas del ADN para estudios poblacionales muy útiles en las ciencias forenses entre ellos tenemos a:

✓ (Builes et al. 2006), quienes llevaron a cabo el trabajo titulado “Estudio de la población peruana con 16 loci Y-STR”; con el cual establecieron una base de datos de 16 Y-STR, considerado una herramienta muy poderosa para la identificación individual y pruebas de paternidad en la medicina forense.

✓ (Builes Gómez et al. 2005), realizaron un estudio de ocho loci STR´s Y-cromosómicos (DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, DYS461, GATA A10, GATA C4 y GATA H4), en el cual analizaron la distribución de la frecuencia alélica de los ocho haplotipos, en una muestra de 87 individuos de la población peruana no relacionada.

✓ (Pérez et al. 2003), determinaron la frecuencia alélica de 13 loci del CODIS en una muestra de la población peruana.

### **2.1.2 Antecedentes internacionales.**

✓ (Villa et al. 2017) en su investigación titulada “Variación de perfiles genéticos obtenidos por PCR con y sin extracción de ADN a partir de manchas de sangre”, menciona que:

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sin extracción es una herramienta clave en investigaciones forenses, tratándose de una de las opciones a elegir cuando se tienen muestras con baja cantidad o calidad del ADN. El objetivo de este estudio fue determinar si hay diferencias entre los perfiles genéticos obtenidos por PCR i) en muestras de ADN extraídas con Chelex® 100, ii) en muestras de ADN obtenidas con el reactivo de purificación de muestras en tarjetas FTA, y iii) por la PCR muestras sin extracción, empleando el kit comercial AmpFLSTR® Identifiler®, utilizado de rutina en el laboratorio IdentiGEN de la Universidad de Antioquia. Los perfiles obtenidos se

analizaron por medio de electroforesis capilar. Los resultados muestran que con los buffers utilizados se obtiene la amplificación de todos los marcadores STRs de las muestras almacenadas en los tres diferentes soportes. Esto permite concluir, que utilizando la PCR sin extracción, además de reducirse los costos y el tiempo de procesamiento de las muestras, se logra obtener perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad establecidos por el laboratorio, generando resultados de manera más eficiente al no ser necesario realizar la extracción y purificación del ADN.

Nuestro trabajo de investigación tiene como objetivo el determinar si la obtención de un perfil genético, que nos permita identificar a un individuo humano, como el aportante de dicha fuente biológica, se relaciona o no con la presencia del ADN en condiciones críticas obtenida de las muestras biológicas recolectadas gracias a la aplicación del reactivo del Bluestar; y con ello obtener la medida de relación existente. Si bien es cierto que el trabajo mencionado como referencia no estudia restos de sangre en condiciones mínimas, nos muestra que los diferentes procedimientos que engloba la extracción de ADN en muestras sanguíneas, pueden presentar carencias en la recuperación del ADN en las cantidades requeridas y en condiciones de calidad que son requeridas para continuar con los procedimientos que culminaran con la obtención de perfiles genéticos necesarios para llegar a la identificación. Mostrándonos como resultado final que el uso de reactivos que no extraen directamente el ADN, sino que lisan las células hemáticas son la mejor opción en el análisis de muestras sanguíneas pues demostraron ser muy eficientes a la hora de ser amplificados con el PCR y se obtuvieron

perfiles genéticos adecuados para la identificación, reduciendo tiempo y costos en los laboratorios forenses.

✓ Hernández & Trejo (2014), en su trabajo de investigación titulado “Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas aplicado a la práctica forense”, mencionan que:

Los marcadores STRs para la secuenciación de ADN en casos forense son populares por trabajar con poca cantidad de ADN e incluso degradados, son manejables para la automatización, son altamente discriminatorios, con resultados fáciles de interpretar y de comparar. Las cuales son analizadas en grupos generalmente en un número de 16 para obtener un perfil genético que permita la identificación plena del aportante de la muestra biológica.

Como lo mencionado anteriormente, nuestro trabajo busca medir la relación existente entre la obtención de un perfiles genéticos, ya sea en forma parcial o la no amplificación, y el estado crítico del ADN presente en las muestras biológicas analizadas; cómo lo mencionado en el trabajo de referencia los marcadores moleculares de tipo STRs son muy populares en las ciencias forenses, debido a su pequeño tamaño, a su gran polimorfismo, y otras características que hacen que estos fragmentos puedan ser secuenciados incluso a partir de ADN degradado y en escasa cantidad, lográndose obtener perfiles genéticos adecuados para la identificación genética; en el caso de nuestra investigación del mismo modo las muestras serán tipificadas usando 16 marcadores moleculares tipo STR's.

✓ Giraldo et al., (2013) en su investigación titulada “Efecto del Bluestar forensics® sobre las pruebas preliminares y de análisis de ADN en la investigación de manchas de sangre”, evaluó:

El comportamiento de las pruebas presuntivas (Thevenon y Roland) de confirmación (sangre humana) y análisis de ADN (cuantificación), para manchas de sangre en escena una vez que la muestra se sometió a agentes químicos como Bluestar Forensics®. Analizó muestras de sangre en diferentes soportes y a diferentes diluciones con el fin de determinar la mínima cantidad de muestra detectable en las pruebas presuntivas, de confirmación y análisis de ADN. Los resultados de las pruebas presuntivas y de confirmación para las muestras tratadas y no tratadas con Bluestar Forensics® se comportaron de igual forma, lo que demuestra que no se afectan. Se recuperó ADN para las manchas de sangre que habían sido reveladas con el agente químico luminiscente, lo que indica que no degrada el ADN. Se halló mayor sensibilidad para las pruebas de Thevenon y Roland y sangre humana, que para el Bluestar Forensics® y el análisis de ADN.

En nuestro trabajo, el reactivo químico que nos va a permitir orientar la existencia de pequeños restos de sangre en la escena del crimen, es el Bluestar Forensics®, por lo que nos interesa conocer si el uso de este reactivo va a empeorar las condiciones críticas en las que ya se encuentra el ADN que se pueda aislar de estas manchas. Como se observa en las conclusiones del trabajo mostrado como antecedente, los ensayos demostraron que la aplicación de este reactivo químico luminiscente no modifica el ADN presente en la muestra analizada, por lo que se espera obtener

resultados de amplificación y tipificación del ADN existente. Con el cual llegar a nuestro objetivo de determinar en qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas recolectadas con el reactivo del Bluestar, no el uso de este no interferirá en nuestro ensayo.

✓ (Prieto 2002), en su memoria titulada “Estudio de Polimorfismo de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados”, concluye que:

Existen diversas formas y/o estrategias de análisis en el estudio de polimorfismos nucleares en muestras muy críticas, trabajando a dos niveles: optimizando la extracción del ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); dos procedimientos que garantizan la obtención de resultados exitosos.

En el estudio que realizaremos la extracción del ADN en las muestras biológicas, esta se llevara a cabo mediante el uso de procedimientos validados para el uso forense, uno, mediante la extracción convencional empleando el Fenol Cloroformo y el segundo, mediante el uso de Kits comerciales, ambos procedimientos garantizan la máxima extracción de moléculas de ADN y la más altísima purificación del mismo, con los cuales se obtendrán moléculas de ADN en cantidad y calidad, adecuadas para seguir con los procedimientos posteriores; en el lado de la amplificación mediante la técnica del PCR se usara la tecnología de la amplificación multiplex de STR's, la cual garantiza la amplificación simultanea de los fragmentos de ADN necesarios para la tipificación posterior y la obtención de los perfiles genéticos. Razones por las cuales el cumplimiento de nuestros objetivos no se verá influenciados, ya que el procedimiento de extracción y

la amplificación, se llevarán a cabo siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio de Forense. Lográndose así determinar en qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico, presente en muestras biológicas recolectadas mediante el uso del reactivo de Bluestar.

## **2.2 Bases teóricas.**

### **2.2.1 La identificación genética humana.**

La Genética Forense comenzó con el descubrimiento del sistema ABO del grupo sanguíneo en el año de 1900 por Karl Landsteiner (Landsteiner 1900) y con la demostración de la herencia de este sistema en 1910 por E. Von Dungern y L. Hirsfeld. Poco después, en 1912, fue utilizado en casos de investigación biológica de paternidad y en el análisis de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre. (Geserick and Wirth 2012). Nuevos antígenos eritrocitarios polimórficos, con una proporción significativa de variantes alélicas en la población y de herencia mendeliana simple como el factor Rh y los sistemas MNSs o Duffy fueron progresivamente incorporados al panel de marcadores genéticos que disponían los genetistas forenses. La propuesta de la estructura de la molécula del ADN como una macromolécula constituida por dos hebras enrolladas una sobre otra en sentido dextrógiro, formando una doble hélice, cada una constituida por secuencias de nucleótidos, unidas entre sí por enlaces fosfodiéster, que contienen la información genética (Watson and Crick 1953); permitió el desarrollo de la genética forense como una herramienta útil en la resolución casos criminales.

La aparición de los polimorfismos proteicos y enzimáticos de eritrocitos y leucocitos analizados por técnicas electroforéticas supuso que a partir de 1960 se disponga de marcadores más informativos y más objetivos. La introducción de los antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad, antígeno leucocitario humano (HLA), revolucionaron en gran medida la prueba biológica de la paternidad a partir de 1970 sobre todo tras los trabajos realizados por el vienés Wolfgang Mayr (Mayr 1971). Sin embargo, tanto los HLA como los anteriores marcadores genéticos presentaban grandes limitaciones cuando se trataban de analizar muestras con el material genético degradado o en minúsculas cantidades lo que es muy frecuente en las muestras forenses. Esta situación cambió con el descubrimiento en la década de 1980 de los polimorfismos del ADN.

Jeffreys en 1985, desarrolló una técnica para distinguir a los individuos dentro de una misma especie utilizando muestras de su ADN. La técnica se basa en que dos seres humanos tienen una gran parte de su secuencia de ADN en común y para distinguir a dos individuos se puede explotar la repetición de secuencias altamente variables llamadas minisatélites o VNTR. Entre dos seres humanos no relacionados será poco probable que tengan el mismo número de minisatélites en un determinado locus. La huella genética se utiliza en la medicina forense para identificar a los sospechosos y/o víctimas a partir de muestras de sangre, cabello, saliva, semen; y en las pruebas de paternidad y filiación. Los microsatélites muestran una mayor variación que el resto del genoma ya que en ellos se encuentran unas secuencias en distinta repetición y con diferente grado de recombinación debido a la inestabilidad del locus. (Jeffreys, Wilson, and Thein 1985)



Con el desarrollo de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fundamentada en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras, empleando ciclos altos y bajos de temperaturas alternadas para separar las hebras recién formadas y dejar que las hebras vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente (Mullis et al. 1988); el análisis de los polimorfismos de ADN, se ha convertido en el procesamiento idóneo en la investigación forense.

Desde que el análisis del ADN basado en repeticiones cortas en tándem (STR) fuera aceptado como método básico en las ciencias forenses (Edwards et al. 1991), está siendo utilizada actualmente en los casos de pruebas de paternidad (Zupanič et al. 2001), pruebas de identificación de restos humanos (Zupanič, Gornjak, and Balažic 2010) y en el complicado trabajo de análisis de casos penales.

El tamaño pequeño de los fragmentos a amplificarse nos permite realizar en una única reacción un ensayo simultáneo de varios fragmentos de ADN mediante amplificación de la PCR multiplex. La técnica de la PCR es una tecnología precisa, sensible y sobre todo presenta rapidez a la hora de detectar los alelos, estas características permiten usarla en la investigación de muestras biológicas involucradas en las ciencias forenses. Los STR's amplificados producto de la PCR, presentan características de fidelidad de la molécula inicialmente amplificada, lo cual permite una fácil interpretación del producto génico tipificado, todas estas bondades nos permiten pensar en la automatización de este proceso. Sumada las características, de la reacción multiplex de la PCR - STR's, con la adición varios fluorocromos y la detección de éstos mediante la electroforesis capilar, han permitido el desarrollo de analizadores genéticos

automatizados, que permiten obtener perfiles genéticos de ADN en forma rápida y robusta.

### **2.2.2 El ADN.**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) de la especie humana está constituida por dos cadenas largas de nucleótidos que forman una doble cadena a forma de hélice, cada unidad nucleotídica está conformada por una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Citosina y Timina), una molécula de azúcar de cinco carbonos (pentosa) y una molécula de ácido fosfórico, estas cadenas de nucleótidos no están aisladas, están unidas mediante enlaces de hidrógeno en forma complementaria. La unión de éstas moléculas no es al azar, sino que gracias a la disposición estructural de cada una de ellas se sucede un fenómeno de complementariedad entre las bases, por lo que la Adenina de una de las cadenas se une a la Timina de la otra, mediante un doble enlace de puentes de hidrógeno, por otro lado la Citosina de una de las cadenas solo se une a la Guanina de la otra mediante un triple enlace de puentes de hidrógeno, a la unión de estas bases nitrogenadas en forma específica, se le conoce como pares de bases y el ADN en las células de los seres vivos está constituida por pares de bases; estos pares de base sufren una transformación, conocida también como la codificación del ADN, por diversos procesos llevados a cabo en las células, por las cuales mediante el ADN se sintetizan diversas proteínas, de las cuales muchas de ellas forman parte de las estructuras celulares, tisulares y orgánicas de un individuo. Esta porción del ADN se denomina ADN codificante, así mismo existe otra porción cuya utilidad es hasta ahora desconocida y recibiendo el nombre de ADN no codificante o “ADN basura” (Watson & Crick, 1953)

Al ADN en conjunto de un organismo se le denomina “genoma” y en su interior están todos los genes que poseemos; el ADN está ubicado: dentro del núcleo de la célula (ADN nuclear, el principal y más importante, que forma los cromosomas) y dentro de las mitocondrias (ADN mitocondrial). Ambos son de interés en el campo de la identificación humana. (Lorente, 2004, p 25)

El ADN, desde el punto de vista que nos interesa, puede dividirse como ADN codificante y ADN no codificante. El ADN codificante es, en general, poco polimórfico, por lo que carece de interés en ciencias forenses con fines de identificación humana; mientras que el ADN no codificante, por sus características y peculiaridades se ha convertido en un instrumento para la individualización de los seres humanos. (Lorente, 2004, pp. 29-31)

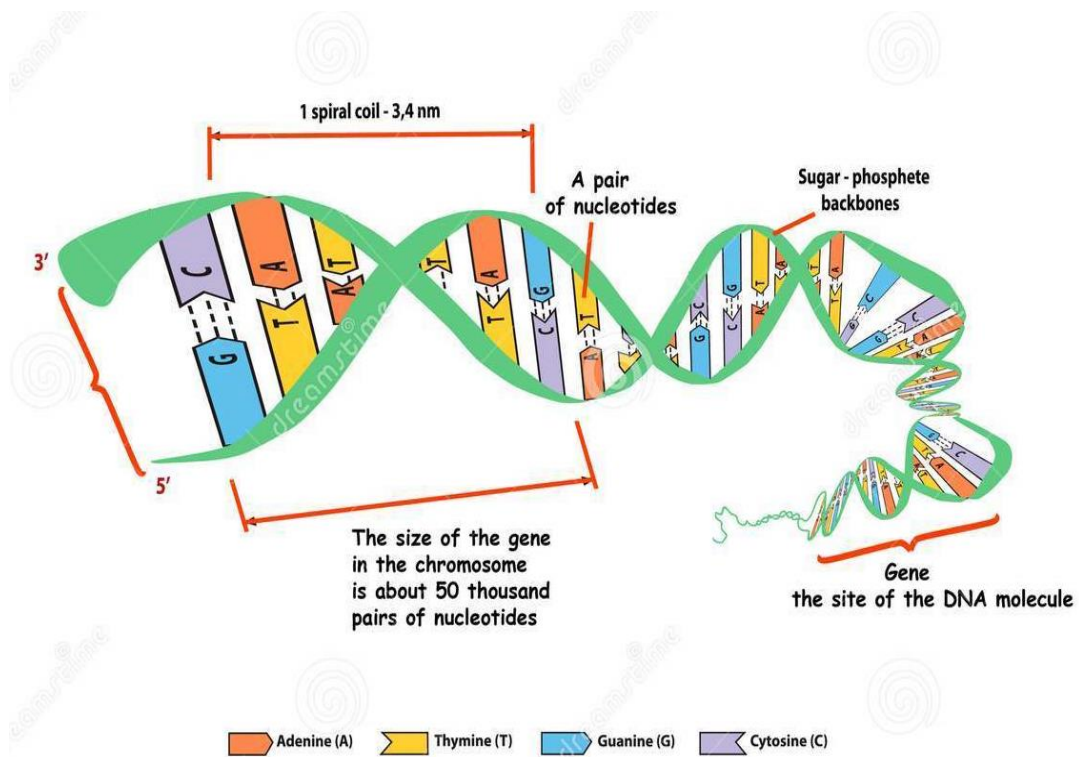


Figura 1: Estructura de la molécula del ADN.

<https://www.google.com/search?q=molecula+del+ADN>

### **2.2.2.1 El ADN óptimo.**

El ADN o genoma humano, suele dividirse en diversos tipos, de acuerdo a la función de repetitividad en relación a su carácter codificante. Se puede dividir en:

□ADN no repetitivo simple o de copia única: este tipo de ADN forma la mayor parte del genoma de un individuo, dependiendo del tipo del organismo, así se tiene que éste constituye el 100% en procariotas, el 80% en eucariotas inferiores y el 50-70% en animales superiores; aproximadamente el 5% de este ADN lo constituyen las secuencias génicas que codifican los diferentes ácidos ribonucleicos (ARN's) y las proteínas que constituyen las estructuras celulares, el otro 5% es el encargado del control de la expresión de las secuencias génicas y el 60% restante es el llamado ADN no codificante (Luque J. A. and Herraes A. 2001).

Del mismo modo el ADN repetitivo, está constituido por secuencias de ADN que aparecen en copias de forma múltiple, este tipo de ADN constituye entre el 20 y el 50% del total del genoma humano (Luque J. A. and Herraes A. 2001). Las llamadas unidades de repetición, secuencias repetidas o simplemente repeticiones, presentan diversos tamaños y cada una de estas se encuentra de forma idéntica o casi idéntica en el genoma. La distribución de estas secuencias puede darse en forma dispersa por todo el genoma entremezcladas con las secuencias de copia única o bien en forma agrupada localizadas en regiones concretas del cromosoma celular.

Una porción del ADN clasificado como repetitivo, tiene un carácter codificante, este contiene la información para expresar un producto considerado funcional, ya sea el

RNA o una proteína. Al resto de ADN, clasificado como repetitivo aún no se le ha encontrado ninguna función clara y/o específica, esta porción de ADN posiblemente se encarga de mantener la estructura de los cromosomas y la cadena de ADN, en su momento, se llegó a proponer el concepto de que esa parte de ADN se le denomine “AND basura” (Ohno S. 1972; Orgel LE and Crick FHC 1980), y llegar a considerarlo como un vestigio de la evolución que aún no se le ha encontrado función alguna. Algunos microsátélites y mini satélites, consideradas secuencias repetidas no codificantes, cuya función aún no se conocen totalmente, estas secuencias tienen gran importancia, sobre todo en las pruebas de identificación genética humana y en algunos estudios de filiación, todo ello gracias al polimorfismo del ADN entre individuos de una misma población.

□ ADN Repetitivo Codificante: este tipo de ADN está constituido por secuencias que constituyen genes los que serán traducidos y darán origen a las proteínas. El tamaño de estos constituye el 10 y 15% del total del genoma. Estos aparecen en forma de familias de genes, las cuales agrupan a miembros que reúnen características en común, ello debido al haber sido originados mediante duplicaciones y/o variaciones de algún gen antecesor. Este tipo de ADN se agrupa a su vez en:

- Familias génicas clásicas: que agrupan genes de histonas y genes de RNA ribosómico.

- Familias multigénicas de genes: que son familias de genes del ser humano de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la globina.

- ADN disperso: Los genes constituyentes de esta familia se localizan en forma dispersa por todo el genoma, a menudo se sitúan en distintos cromosomas. En este tipo de familias los genes se encuentran codificando proteínas de diversas funciones: ya sea enzimáticas, reguladoras, de almacenamiento, estructurales, etc.

□ ADN Repetitivo no Codificante. Este tipo de ADN se encuentra entre un 20 y 40% del ADN genómico total y a su vez se divide en:

- ADN altamente repetitivo y agrupado: este tipo de ADN está constituido por ADN satélite y se encuentra constituido por el 10 al 30% del genoma (Smit AF, 1999). Este grupo de ADN está conformado por pequeñas unidades de alrededor de 2 a 50 pares de bases. Estos ocupan lugares específicos dentro de los cromosomas, estas regiones se ubican principalmente en torno al centrómero y a los telómeros, estas regiones son denominadas también regiones heterocromáticas (Luque J. A. and Herraes A. 2001)

- ADN moderadamente repetitivo y disperso: este tipo de ADN se distribuye a lo largo de todos los cromosomas que constituyen el material genético, estas repeticiones van en un número no muy elevado  $10^2$  y  $10^4$ , éste a su vez se divide en dos categorías, en relación a la forma del cómo se distribuyen estas repeticiones, esta primera categoría, agrupa algunas secuencias que se repiten en tándem las cuales forman bloques, estos aparecen de forma dispersa en el genoma y forman los grupos denominados mini satélites, este grupo está formado por 10 a 65 pb repetidos, estas repeticiones son ricas en Guanina y Citocina (Jeffreys, Wilson, and Thein 1985) y microsatélites, los cuales también son llamados Short tándem repeat o STR, en este grupo las repeticiones van en

un número inferior a 7 pb y estos se agrupan en tándem, constituidos hasta 50 repeticiones (Weber JL and May PE 1989). La segunda categoría está constituida por repeticiones, que igualmente están dispersas por todo el genoma humano, pero que a diferencia de la otra no está agrupada en bloque y a su vez se subdivide en dos familias, ello de acuerdo al tamaño que forman los pares de bases (Smit AF 1999). Esta clasificación es en:

Short Interspersed Nuclear Elements (SINES) y Long Interspersed Nuclear Elements (LINES).

Los diferentes locus del ADN microsatélite, hoy en día son los elementos genéticos de mayor interés en el campo de la identificación genética humana. Según Richards y Sutherland (1992) en cada 6-10 kilo bases (Kb) del genoma humano suele encontrarse una secuencia de este tipo. En la actualidad los de mayor interés en el campo forense, son los loci tri y tetraédricos, cuya distribución se estima que van cada 15 kb en el genoma (Edwards et al. 1991).

Las pequeñas unidades amplificadas necesarias para la identificación humana, pueden ser estudiadas simultáneamente gracias a la amplificación de varios loci mediante la amplificación multiplex de la PCR, así mismo la identificación precisa de cada uno de los alelos obtenidos en la electroforesis de la secuenciación de ADN. Las características de amplificación de los alelos mediante la PCR, permiten el análisis en forma precisa, son pruebas muy sensibles y sobre todo han disminuido el tiempo de reacción, haciéndolos más rápidos. Todas estas características hacen posible la investigación en



especímenes biológicos en las ciencias forenses. La amplificación de los STR de 3 (triméricos) y 4 (tetraméricos) bloques mantienen fidedignamente sus características. La tipificación genética mediante este tipo de estudio es de fácil interpretación, así mismo es susceptible a automatización. La electroforesis capilar es una tecnología automatizada que junto con la PCR multiplex de los STR resultan siendo una técnica rápida y poderosa para la obtención de perfiles genéticos de ADN.

#### ***2.2.2.2 El ADN crítico.***

En la mayoría de los crímenes violentos existe un intercambio de material biológico entre el autor o autores y la víctima o víctimas. Un análisis adecuado de estos productos puede llevar a la correcta resolución de la investigación criminal, mientras que un trabajo superficial o inadecuado puede representar un fracaso en las labores de justicia.

El ADN en cada persona presenta una distribución única, esta peculiar característica ha permitido desarrollar una revolución en las ciencias criminalísticas, así mismo la introducción de las nuevas técnicas que permiten el análisis de este ADN en particular, viene sirviendo en la resolución de casos cuyo objetivo es diferenciar a un ser humano de entre todos los demás. El material genético presente en las diferentes células que constituyen un organismo vivo es el mismo, por lo que el análisis adecuado de estos elementos, que se denominan indicios biológicos, recolectados en la escena criminal y su posterior homologación con el material genético de la persona indubitada facilita la identificación de inclusión y/o exclusión de la persona implicada en el suceso. Es posible llegar a la identificación genética humana a partir de indicios biológicos en cantidad

mínimas, como las manchas latentes. Además se hace posible obtener información de manchas latentes muy antiguas, llegando incluso al examen después de muchos años.(Lorente, 2004, p. 50)

El análisis genético de muestras biológicas desconocidas (aquéllas que no se sabe de quién proceden) que están relacionadas con hechos delictivos comprende una serie de pasos en los laboratorios: extracción del ADN (es decir, separación de los ácidos ribonucleicos del resto de componentes celulares), cuantificación y cualificación del ADN extraído (con el fin de conocer si nos enfrentamos al análisis de una muestra con suficiente calidad y cantidad de ADN o por el contrario estamos ante una muestra con ADN crítico), amplificación del ADN con la PCR (el cual produce muchas copias de los fragmentos de ADN que nos interesan) y la electroforesis capilar (para lograr la separación y detección de los fragmentos de ADN).

Las muestras biológicas consideradas de referencia o halladas en óptimas condiciones en las escenas del delito presentan características de óptima calidad y contienen cantidades adecuadas de ADN, los cuales permiten obtener perfiles genéticos completos (todos los marcadores genéticos analizados), estos perfiles genéticos pueden ser comparados de forma fáctica con los perfiles genéticos obtenidos de las muestras indubitadas provenientes de los sospechosos y/o víctima(s). Sin embargo, los laboratorios de ADN suelen obtener resultados con perfiles genéticos que dificultan la interpretación, debido a que estos perfiles genéticos recolectados en las escenas de los crímenes proceden de muestras biológicas de mala calidad (por su antigüedad o por su

mala preservación) o que presentan escasas cantidades de ADN y por tanto se obtienen perfiles genéticos incompletos, parciales o no amplificados. (Arbeláez and Ríos 2009)

El aislamiento del ADN crítico (antiguo, expuesto a insumos químicos o condiciones físicas que incrementan su deterioro) requiere de procedimientos y precauciones bastante diferentes de la extracción estándar del ADN fresco. No solo debido a su escasa cantidad o su alto grado de degradación sino también a la presencia de inhibidores que interfieren en el proceso de la PCR.

#### **2.2.2.2.1 Ausencia del ADN**

El aislamiento del ADN, es un procedimiento que continúa luego de la confirmación de la existencia de restos sanguíneos de origen humano, la para detectar la presencia de las moléculas de ADN y la cantidad en la que esta se encuentra se emplean diversas pruebas, entre ellas tenemos a la cuantificación por espectrofotometría y la PCR en tiempo real (qPCR).

Con la cuantificación de las moléculas mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

De este modo la concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que la relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

Mientras que en la cuantificación por qPCR, las reacciones se caracterizan por el punto en el tiempo durante el ciclo cuando se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo en lugar de la cantidad de objetivo acumulada después de un número fijo de ciclos. Cuanto mayor es el número de copias iniciales de la diana de ácido nucleico, antes se observa un aumento significativo en la fluorescencia. Por el contrario, un ensayo de punto final (también llamado "ensayo de lectura de placa") mide la cantidad de producto de PCR acumulado al final del ciclo de PCR.

Se considerará ausencia de ADN en las muestras biológicas analizadas si por alguna de las dos metodologías señaladas no se evidencia de la presencia del mismo. Debido a no obtener valores que evidencien su presencia.

#### **2.2.2.2 Escasez del ADN**

Uno de los principales problemas de la genética forense es la dificultad en el análisis de ADN altamente degradado o ADN de bajo número de copias (LCN). El ADN de LCN se define arbitrariamente como menos de 100 picogramos (pg) de plantilla (Gill P et al. 2000). El pequeño número de copias de plantillas y la disponibilidad de solo fragmentos de ADN cortos dan como resultado la falta de amplificación de algunos

fragmentos de ADN. En consecuencia, los abandonos de locus y alelos, que son síntomas de efecto estocástico (Butler J. 2010), perturban el análisis adecuado de las huellas biológicas.

La amplificación del material genético a través de la PCR, requiere de cierta cantidad mínima de ADN, para obtener un producto visualizable ya sea una banda o un pico. La sensibilidad de la técnica de la PCR se relaciona con los falsos negativos, ya que puede que una muestra sea positiva, pero sea dada como negativa porque no se ha amplificado debido a no tener la cantidad de ADN suficiente. Estas cantidades dependen de cada kit de amplificación, oscilando estos valores en 1 ng/ $\mu$ L para las STRs.

#### **2.2.2.2.3 Degradación del ADN.**

Una de las importantes ventajas que aporta la técnica de la PCR es la capacidad de poder amplificar material genético que se encuentre parcialmente degradado, no obstante, cuando este nivel de degradación es muy elevado la amplificación de marcadores genéticos clásicos por la técnica de la PCR, dentro del campo forense, es realmente complicado.

Cuando se recogen evidencias que han sido expuestas durante un cierto periodo de tiempo a condiciones naturales de humedad ambiental, fenómenos meteorológicos, acción de insectos, etc.; es muy probable que esa muestra presente un cierto grado de degradación natural, siempre inevitable, en otras ocasiones, cuando la recogida y sobre todo el envío de esas evidencias no se realizan de la manera adecuada pueden aparecer

problemas de degradación, evitables con un correcto procedimiento. (Martínez, 1999, p. 168)

Cuando se habla de ADN degradado se hace referencia al material genético que, por acción, generalmente bacteriana, sufre fragmentación de forma inespecífica por causa de las nucleasas. Al margen de los productos que el ADN puede arrastrar, a lo largo del proceso de extracción del ADN crítico, la molécula del ADN puede verse dañada por factores generalmente medioambientales señalados anteriormente.

Este proceso puede afectar la investigación del ADN crítico, fragmentando las hebras hasta el punto de hacerlas inútiles para el estudio (rotura del enlace N-glicosídico) o deteriorándolas parcialmente, pero generando productos capaces de inhibir la PCR (daño hidrolítico). (Martínez 1999)

#### **2.2.2.2.4 Inhibidores del ADN.**

Los inhibidores de la PCR son contaminantes orgánicos e inorgánicos incluidos en la muestra de ADN que interfieren atenuando o inhibiendo completamente la reacción de amplificación por PCR. Se han reportado una amplia variedad y son particularmente abundantes en muestras complejas y con altas concentraciones bacterianas. Debido a que muchos de ellos exhiben una solubilidad similar al ADN no son removidos eficientemente durante el proceso de extracción con métodos convencionales. Los inhibidores pueden actuar directamente inhibiendo la acción de la *Taq* polimerasa o como en el caso de las proteínas y carbohidratos pueden unirse los iones de magnesio no dejándolos disponibles para la polimerasa. Afortunadamente, existe una amplia gama de

métodos y Kits comerciales que permiten deshacerse de los distintos inhibidores de la PCR.

Dentro de los inhibidores más comunes que se encuentran en las muestras biológicas tenemos a los ácidos húmico y fúlvicos, que son una familia de moléculas muy abundantes en el suelo y que son inhibidores muy potentes de la PCR. (Martínez 1999)

Los derivados de la porfirina, o sus productos de degradación, también han sido señalados como inhibidores por algunos autores, las porfirinas se encuentran presentes en la sangre, tejidos blandos y en hojas vegetales. (Martínez 1999)

Algunos otros de los inhibidores referidos son la hematina, presente en la sangre; la queratina, presente en los pelos y uñas, los taninos, colorantes usados en las industrias textiles; la urea, en la orina y las sales biliares en las heces.

### **2.2.3 Muestras biológicas.**

Las muestras biológicas desempeñan un papel fundamental en la investigación a nivel molecular, debido a que son un depósito de información sobre las características genéticas de cada individuo.

#### **2.2.3.1 La sangre.**

Es un tejido particular, rojo, viscoso, coagulable en el cual las sustancias intercelulares circulan por el corazón, las venas, arterias y capilares. Químicamente es un sistema heterogéneo, constituido por una fase líquida (plasma) que tiene en suspensión

eritrocitos, leucocitos, plaquetas, etc. Transporta oxígeno a los tejidos y anhídrido carbónico desde estos a los pulmones, sustancias nutritivas absorbidas por los intestinos, sustancias protectoras, anticuerpos, hormonas y colabora en el mantenimiento y regulación de la temperatura corporal, la presión osmótica y arterial y el equilibrio acuoso nacido-base (Santos J.E., 2011, pp 22).

La sangre consta de distintas partes o componentes, que son: los glóbulos rojos, los glóbulos blancos, las plaquetas y el plasma.

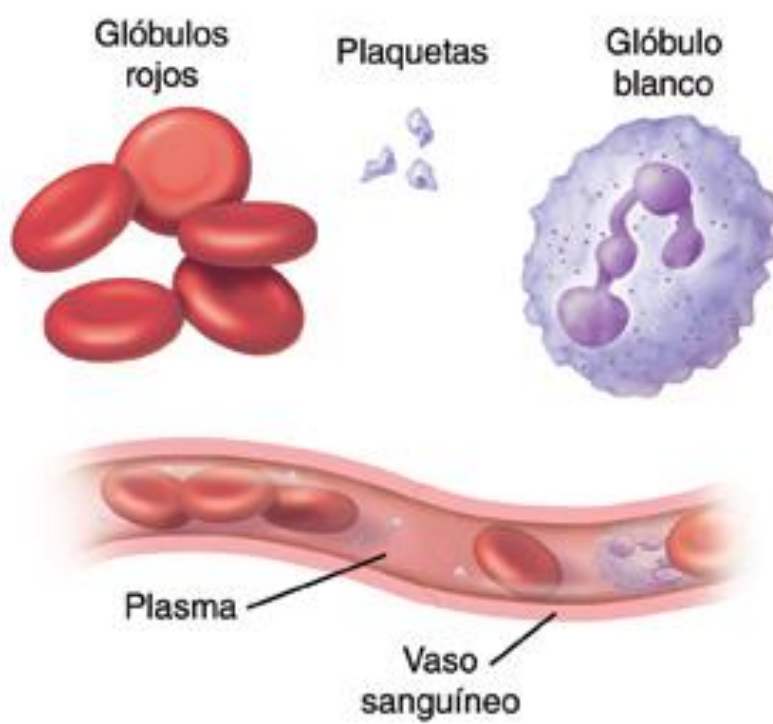
Los glóbulos rojos (llamados también “eritrocitos” o “hematíes”) son células que transportan oxígeno por todo el cuerpo. Cada glóbulo rojo vive aproximadamente cuatro meses. Los glóbulos rojos contienen una proteína llamada hemoglobina, la cual les permite recoger el oxígeno de los pulmones. El cuerpo necesita hierro para producir hemoglobina.

Los glóbulos blancos (llamados también “leucocitos”) son células que forman parte del sistema inmunitario del cuerpo, y ayudan a combatir las infecciones y las enfermedades. Hay distintos tipos de glóbulos blancos: neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Según el tipo de célula, los glóbulos blancos viven durante varios días, meses o años.

Las plaquetas (llamadas también “trombocitos”) son células que ayudan a coagular la sangre. Tras una cortada o magulladura, las plaquetas se adhieren entre sí para formar un coágulo o “tapón” que ayuda a controlar el sangrado, impidiendo que el cuerpo pierda demasiada sangre. Las plaquetas viven en el cuerpo entre 7 y 10 días.



El plasma es la parte líquida de la sangre. Este líquido transporta los distintos tipos de células de la sangre a todas las partes del cuerpo; además, el plasma transporta unas proteínas llamadas “factores de coagulación” que ayudan a las plaquetas a formar coágulos.



*Figura 2: Componentes de la sangre.*

### **2.2.3.2 Manchas de sangre.**

En las investigaciones de los diversos delitos de violencia, y otros delitos donde se atenta contra la integridad de las personas; las manchas de sangre constituyen la prueba que presenta un gran valor y su frecuencia de aparición es muy elevada. Los restos sanguíneos suelen aparecer en el lugar de los hechos como un fluido (líquido) o a medida que transcurre el tiempo mostrarse o como una mancha.

Las manchas de sangre tienen diferentes aspectos, estos van a depender de si son recientes o no y también del tipo del soporte en el que se encuentren. Estas manchas pueden ser de color rojo vivo, si son frescas o recientes, o más oscuras a medida que transcurre el tiempo (antiguas), tornándose cada vez a un color más oscuro llegando finalmente a ser negrozco debido a la oxidación de la hemoglobina. Si estas manchas han sido lavadas con agua o algún otro líquido, el color se va tornando rosa, el pigmento de la hemoglobina se va difundiéndose, lo que genera la formación de una forma irregular observándose áreas más densas que otras. Sin embargo hay muchas manchas que pueden no parecer sangre y al verificar con las diferentes pruebas de laboratorio se comprueban que si se trata de estas. Las pruebas utilizadas son altamente sensibles, permitiéndonos analizar trazas de sangre pero que carecen de especificidad. (Arbeláez and Ríos 2009)

### **2.2.3.3 Pruebas de orientación.**

Existen sustancias orgánicas e inorgánicas que tienen semejanza con la sangre. En este caso la diagnosis criminalística es de mucha importancia para llevar la investigación a un resultado positivo. Entre estas sustancias tenemos vegetales, como la mora, fresa, beterraga, tomate; látex, la sangre de grado, el carmín; vino, etc. Entre las

sustancias químicas: el asepsil rojo, tintura de yodo, anilina y mezclas como la cera de piso, etc. (Santos J.E., 2011, p 32)

Las pruebas de orientación son aquellas que nos revelan el origen y/o naturaleza de la mancha, pero no son de todas certeras; por lo que solo sirven para descartar la naturaleza de estas, mas no son concluyentes. Estas pruebas son de fácil aplicación, de bajo presupuesto, de rápida reacción, las cuales nos permiten ayudan a distinguir las manchas a analizar.

La hemoglobina está contenida en los eritrocitos, siendo la proteína más abundante en este tejido y por ende en las manchas que se originan a partir de ellas. Razón por la cual estas pruebas se fundamentan en esta característica y sobre todo en la capacidad que posee el grupo “Hemo” de la proteína, la cual ejerce una actividad peroxidasa, esta aporta al sistema del peróxido de hidrógeno (reaccionante) induciendo el desprendimiento del oxígeno por descomposición del peróxido, este compuesto actúa sobre un sustrato orgánico reducido, como la sangre, transformándolo en su forma oxidada cromática. (García 2008)

La aparición de un color característico, dependiendo del reactivo cromógeno utilizado, indicara la presunta presencia de sangre en la mancha estudiada. Cuando la reacción del cromógeno produzca luminiscencia la prueba se efectuará en la oscuridad, como es en el caso de los reactivos de Luminol y/o Bluestar. (Santos J.E., 2011, p 33)

Jean - Marc Lefebvre - Despeaux, que en el año 2000 se desempeñaba como presidente de la compañía de Bluestar®, encargo al Ph.D. Loic Blum, quien fuese

profesor de la Universidad Claude Bernard - Lyon y desempeñaba el cargo de director del laboratorio de ingeniería enzimática y biomolecular que buscara la manera de mejorar la fórmula del Luminol, consiguiendo la eliminación de los numerosos inconvenientes que se presentan en este reactivo. Resultado de este estudio, Blum consiguió desarrollar una nueva fórmula a la que posteriormente la denominaron Bluestar® Forensic. (Santos J.E., 2011, pp. 37-38)

La sensibilidad de Bluestar según refiere la ficha técnica es de 1:10 000, pero algunos estudios refieren sensibilidades que llegan hasta 1: 1 000 000. Bluestar tiene la luminiscencia más fuerte y duradera comparada con el Luminol, por lo que este no requiere oscuridad absoluta, disminuye los falsos positivos ya que la luminiscencia difiere de color, intensidad y duración. Así mismo se ha demostrado que este reactivo no altera la molécula del ADN lo que permite el desarrollo de otras pruebas en los laboratorios de biología molecular. (Arbeláez and Ríos 2009; Santos J.E. 2011)

#### ***2.2.3.4 Pruebas de individualización.***

Se utilizan técnicas de biología molecular para la amplificación del ADN mediante la PCR, con el uso de marcadores genéticos específicos para la especie humana, cuyos fragmentos amplificados serán analizados mediante la electroforesis capilar, con los cuales se elaboran los perfiles genéticos propios de cada individuo.

#### **2.2.4 El perfil genético.**

Antes de profundizar en la definición de perfil genético, debe quedar en claro que este es posible gracias a la característica polimórfica del ADN.

El Polimorfismo del ADN se define como la variedad existente, en las secuencias de ADN. Este término fue acuñado por Ford en 1940, como la “Aparición conjunta de dos o más formas discontinuas de una especie, de tal forma que la más rara de ellas no se pueda mantener simplemente por mutación periódica”. Este se divide en dos:

**Polimorfismos de Secuencia:** se refiere al cambio de uno o más nucleótidos de ADN en una misma secuencia, estos son poco polimórficos y su ocurrencia es frecuente en las secuencias codificantes.

**Polimorfismos de Longitud:** este tipo de polimorfismo se genera por inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Este tipo de polimorfismo especialmente se encuentra en los segmentos de ADN repetitivo denominados mini satélites y microsatélites.

A partir de la década de los noventa los polimorfismos de tipo minisatélites y microsatélites, son los más usados en las ciencias forenses, siendo los microsatélites los más polimórficos de estos dos, presentando un alto grado de heterocigosidad, debido a su regular distribución en el genoma y su pequeño tamaño los hacen fácilmente detectables con la tecnología de la PCR, y permitiendo la amplificación de varios loci simultáneamente en una sola reacción (PCR multiplex). Los polimorfismos de los microsatélites ocurren por variaciones en el tamaño de los alelos o por variaciones en la secuencia de la unidad de repetición.

Esta característica del polimorfismo del ADN permite distinguir a una persona de otra y resulta, por consiguiente, una clave para la identificación genética de un individuo, a excepción de los gemelos univitelinos.

El polimorfismo de la secuencia de ADN los STR's radica en que las variaciones del número de repeticiones en la secuencia. Pero, además, estos STR's pueden variar en su longitud en la unidad de repeticiones y en el modelo que puedan formar estas repeticiones. Estas unidades simples de repetición contienen unidades de longitud y secuencia idéntica, por otro lado, las llamadas unidades complejas de repetición contienen bloques de unidades repetición de longitud variable y de un mayor y/o menor número de variación de las secuencias. Sobre la base de estos se pueden encontrar dos tipos de STR's.

Los STR's que poseen un bajo número de alelos (<12) pero bien diferenciados.

Los STR's que poseen un elevado número de alelos (>35) pero poco diferenciados.

Contrariamente de que los loci del segundo grupo son los más polimórficos dentro de estos dos grupos, no son los más usados en identificación humana puesto que al tener alelos que difieren en número de repeticiones y que a veces se encuentran intercaladas entre otras normales, es necesario de un análisis más preciso y poco práctico.

Por lo que los STR's más utilizados son el tri, tetra y pentanucleotídicos, mientras que los dinucleotídicos suelen presentar bandas sombra o tartamudas (stutterbands) como consecuencia de la amplificación inespecífica.

El uso de las secuencias de ADN tipo microsatélite presenta grandes ventajas sobre otros:

La técnica de PCR, permite obtener millones de copias del fragmento de ADN requerido para el estudio genético, este procedimiento requiere un tiempo de 2 o 3 horas, dependiendo del kit utilizado, así mismo, esta técnica permite analizar muestras cuyo ADN se encuentra en cantidades muy escasas.

Los sistemas de STR's dejan ver alelos definidos con precisión, permitiendo simplificar el análisis estadístico de las frecuencias alélicas en las poblaciones de estudio y por otro lado es mucho más sencilla la estandarización y la comparación de los resultados entre los diferentes laboratorios de genética forense.

El uso de analizadores genéticos automatizados, basados en el análisis de fragmentos de ADN marcados con fluorocromos fluorescentes ha permitido detectar diferentes loci de STR's en diferentes sistemas. Este nuevo sistema incorpora la medición de diversos fragmentos de ADN, los cuales son productos de la PCR y eliminan las diferencias en la migración electroforética que ocurre entre las canales de gel, como la agarosa, ya que incorpora marcadores de tamaños internos con cada muestra o los size standar.



La nomenclatura para designar un marcador genético se basa en su ubicación cromosómica. Si este marcador está dentro de un gen específico o muy cercano a él; y si dicho gen tiene función conocida y se le ha asignado un nombre, el marcador genético utilizado tendrá un nombre derivado con relación a dicho gen, sin embargo para los fragmentos de DNA en los cuales no se conoce su función, se sigue la siguiente nomenclatura:

D : designa DNA

Cromosoma número : 1, 2, 3, ..., X, Y, N (multilocus)

S, Z, F : se refiere a la complejidad del segmento.

S: segmento único

Z: segmento repetitivo en sitio específico

F: secuencia homóloga en múltiples cromosomas

De acuerdo a la comisión de ADN de la International Society of Forensic Genetics (ISFG) se recomienda que la denominación de los alelos STRs se realice según el número de unidades de repetición (UR) completas de tal manera que cuando alguno tuviera una UR incompleta se designara el número de UR completas y a continuación separándolas por un punto el número de pb de la UR incompleta (Gill P et al. 2000).

Se denomina perfil genético a una serie de números (alelos), que son característicos en cada individuo, en referencia a una serie de fragmentos de ADN llamados marcadores genéticos, los cuales pueden ser observados en la siguiente tabla.

*Tabla 1. Perfil genético de distintas muestras biológicas forenses.*

N°	Loci Estudiados	Sangre	Saliva	Cabellos
1	<b>D3S1358</b>	15/18	16	14/15
2	<b>vWA</b>	16	16	16/17
3	<b>D16S539</b>	09/13	09/13	10/12
4	<b>CSF1PO</b>	10/12	12	10
5	<b>D6S1043</b>	14/19	14/22.3	18/21.3
6	<b>Yindel</b>	ND	02	02
7	<b>Amelogenina</b>	X	XY	XY
8	<b>D8S1179</b>	13/14	10/13	12
9	<b>D21S11</b>	30	30	31.2/32.2
10	<b>D18S51</b>	15/18	17/18	15/17
11	<b>D5S818</b>	11/12	11	07/11
12	<b>D2S441</b>	11.3/12	10	10/14
13	<b>D19S433</b>	13/14	12/15.2	13.2/14
14	<b>FGA</b>	17/23	19/25	22/25
15	<b>D10S1248</b>	14	14	13/15
16	<b>D22S1045</b>	15/16	15/16	15/16
17	<b>D1S1656</b>	16/17	13/15	14
18	<b>D13S317</b>	11/13	10/11	09
19	<b>D7S820</b>	09/12	10	08/11
20	<b>Penta E</b>	16	12/17	14
21	<b>Penta D</b>	10/12	10/11	09/12
22	<b>TH01</b>	06/09	06/07	07/09.3
23	<b>D12S391</b>	17/19	17/20	18/20
24	<b>D2S1338</b>	19/23	17/19	21/25
25	<b>TPOX</b>	08/09	08/11	11/12

Fuente: Elaboración propia.

Cada uno de los marcadores genéticos representa un fragmento de ADN que consta de unas 100-500 pares de bases, por lo que se estudia una pequeña porción de todo el ADN presente en cada individuo, el cual está formado por unos 3000 millones de pares de base. El total de marcadores genéticos estudiados ha ido incrementando a lo largo de los años, estando hoy en unos 24-25 marcadores, los cuales incluyen la amelogenina.

En cada marcador genético, un individuo presenta dos alelos (números) como máximo, siendo estos heterocigotos y homocigotos, cada uno procedente del padre y de la madre.

Los marcadores moleculares más empleados en las pruebas de ADN son los llamados microsatélites, que no son más que repeticiones cortas en tándem o STR's. Estos STR's están compuestos de repeticiones de secuencias de corto tamaño (como GATC) que dan lugar a varios alelos los cuales reciben la nomenclatura en relación al número de veces que se repetida la secuencia; por lo que por ejemplo, un alelo representado por el número tres no es más que la repetición de tres veces de la secuencia GATC (de este modo: GATC, GATC, GATC), esta es la lógica seguida para todos y cada uno de los alelos (Figura 3). (Villalobos 2017)



Figura 3: Short Tandem Repeats (STRs) de 7 a 12 repeticiones.

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.). Se debe señalar que la nomenclatura para cada sistema de STR's puede ser diferente entre uno y otro marcador. Si un marcador genético presenta dos alelos diferentes se trata de un marcador genético de tipo heterocigoto, mientras que si presenta dos alelos iguales se trata de un tipo homocigoto. (Figura 4) (Villalobos 2017)

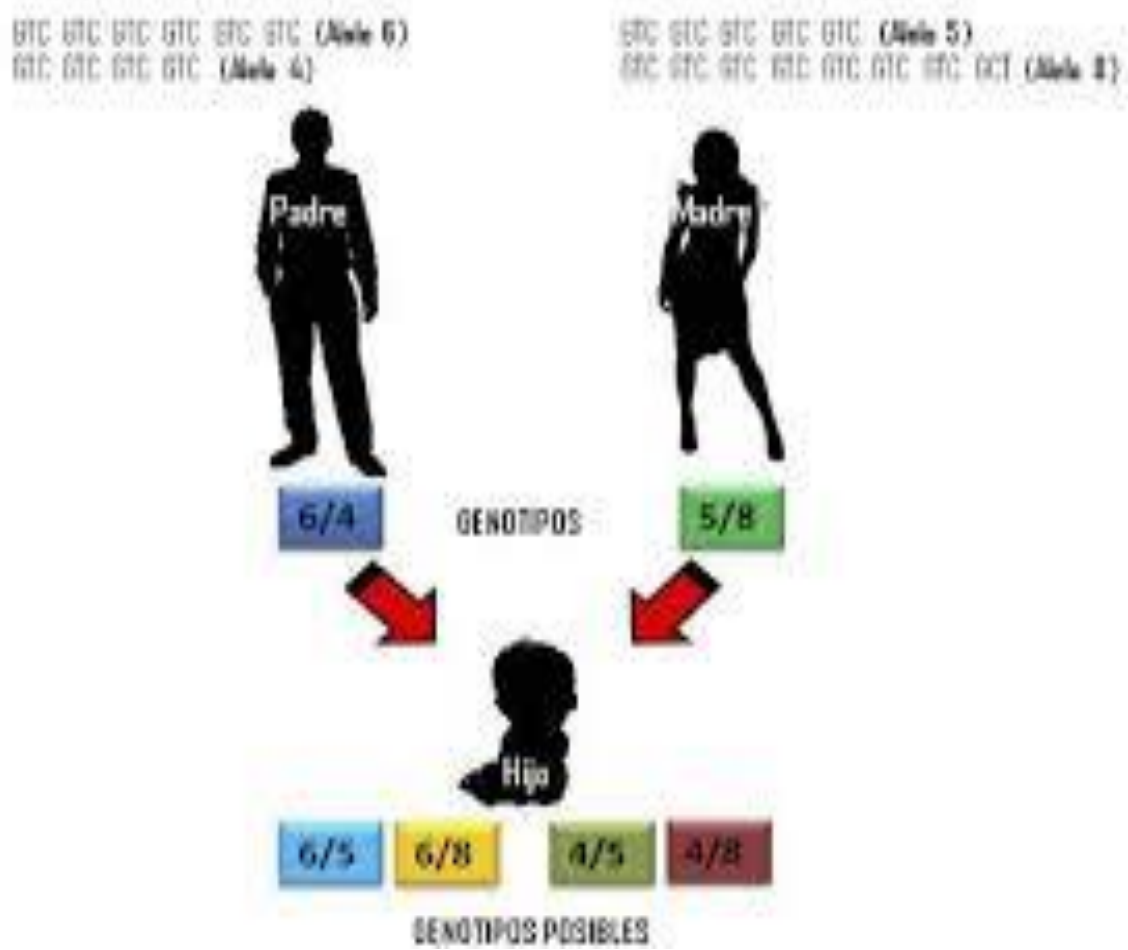


Figura 4: Herencia de los marcadores microsatélites STR's (Short tandem repeats).

A inicios de la década de los años 90's se dio un intenso apogeo en la investigación y búsqueda de un número mayor de marcadores genéticos de tipo de los STR's todos ellos enfocados en temas de identificación humana. Durante este proceso estuvieron involucrados muchos investigadores, dentro de estos se vio la participación de diversas agencias de justicia como el Federal Bureau of Investigation de los EE. UU o el Forensic Science Service del Reino Unido (UK), así como también algunas empresas privadas, como Promega (Madison, WI) y Applied Biosystems (Foster City, CA), quienes publicaron sus validaciones de los distintos kits que incluyen diferentes marcadores genéticos. En el año de 1997, específicamente en el mes de noviembre, el FBI estableció 13 marcadores genéticos de tipo STR's y los incluyó en un sistema denominado Combined DNA Index System (CODIS), el cual constituyó un sistema núcleo de marcadores necesarios para generar e intercambiar perfiles genéticos en los Estados Unidos de Norteamérica, con fines de impartición de justicia y generación de bases de datos de ADN relacionado con temas criminales. Los STR's del CODIS son: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11 y Amelogenina (como marcador sexual). El FBI formó un grupo especializado de trabajo llamado Core Loci Working Group, cuyas conclusiones fueron publicadas en el año 2012 y se determinaron los STR's requeridos y sugeridos en orden de preferencia, que aplicarían en EE. UU a partir del 2017. De igual forma, el continente europeo formó un sistema de identificación denominado European Standard Set (ESS), el cual consta de diversos STR's y algunos de ellos son compartidos con el sistema CODIS, incluyendo el D2S1338 y D19S43. (Villalobos 2017).

Una vez obtenidos los perfiles genéticos, estos deben ser sometidos a un riguroso proceso de revisión e interpretación. Inicialmente destaca la revisión de controles negativos (sin ADN) y positivos (ADN conocido), para detectar una posible contaminación y para confirmar que la amplificación por PCR fue correcta. Es conveniente revisar la posible ganancia de alelos (drop-in) o pérdida alélica (drop-out), los cuales son más frecuentes en muestras degradadas o con cantidades mínimas de ADN, lo que ocasiona resultados estocásticos o azarosos que no son reproducibles y no representan el verdadero perfil genético. Una vez verificada la rigurosa observancia de los procesos de gestión de calidad a los que todos los laboratorios de genética forense deben apegarse se realiza una comparación para verificar la concordancia entre perfiles genéticos, y establecer si un individuo inculcado es la fuente u origen de una evidencia biológica encontrada en la escena de un crimen. (Villalobos 2017)

#### ***2.2.4.1 Perfil genético parcial***

En una situación ideal, tendríamos de suficiente ADN para generar un perfil completo (utilizando al menos 15 marcadores más un marcador de sexo). Sin embargo, esto no es siempre posible. Si el ADN solo se recupera en pequeñas cantidades o se ha deteriorado por la temperatura, la humedad u otros elementos, puede que falten algunos alelos (números) en algunos marcadores. Esto daría un perfil parcial de ADN.

Debido a esto, solo si dos perfiles de ADN tienen exactamente el mismo patrón de ADN, estamos ante una coincidencia total. Además, hay mucha contaminación en las cosas que nos rodean y el ADN no se suele depositar en lugares limpios donde nadie haya estado. Si una muestra del lugar del delito contiene el ADN de dos o más personas,



nos referimos a él como un perfil de ADN mezclado. Como el ADN llega a todas partes, potencialmente todas las muestras de ADN del lugar del delito pueden ser mezclas. Esto no supone ningún problema, a menos que el ADN que se esté tratando de analizar esté presente en niveles tan bajos que se confunda con este ADN de fondo, o bien con el ADN de otro contribuyente (p ej., una víctima). En situaciones de este tipo, los métodos informatizados modernos permiten calcular el valor de la prueba, que se debe comunicar a los investigadores, jueces y miembros del jurado.

#### ***2.2.4.2 Perfil genético no amplificado***

La obtención de perfiles genéticos y la utilización de estos para la identificación genética humana se ha incrementado a través de en los últimos años, sin embargo, estas pruebas presentan algunas limitaciones propias del sistema.

Algunas de estas limitaciones son propias a la naturaleza biológica de los mismos, tal como son las mutaciones genéticas, algunos patrones tri-alélicos, y otros, todos estos interfieren en el estudio y complican el análisis e interpretación de los resultados obtenidos, estas dificultades se ven reflejadas en la dificultad de obtención de un perfil genético. Del mismo modo, existen algunos otros problemas y varias limitaciones las cuales se relacionan estrechamente con los procesos analíticos, todos ellos motivados fundamentalmente en la calidad de las muestras biológicas recuperadas en las escenas de los crímenes, las cuales son analizadas posteriormente en los laboratorios de genética forense. Dentro de los métodos usuales que son requeridos en la obtención de un perfil genético, como la extracción de ADN, cuantificación, amplificación, etc. Muchas veces suelen no ser el 100% eficaces; significando ello que si

una muestra biológica contiene unas 10 000 copias del fragmento de ADN que queremos estudiar (marcador genético molecular) se va ver imposible lograr obtener exactamente unas 10 000 copias del mismo fragmento después de la extracción de ADN, que es el primer paso del análisis genético, ocurriendo la misma figura en los subsecuentes pasos en el proceso de análisis. A pesar de que se cuenta solo con esta cantidad de copias de partida, se puede obtener cantidad de ADN suficiente para proseguir con los procedimientos y obtener finalmente un resultado exitoso. Contrariamente, cuando se cuenta con una cantidad mínima de ADN para iniciar el procedimiento es necesario hacer uso de diversos procesos que vayan a incrementar la eficacia de los procedimientos, sin embargo, estos resultados finales pueden verse comprometidos. En el análisis de este tipo de muestras, suele presentarse un efecto denominado el estocástico, el resulta en la no amplificación de perfiles genéticos en este tipo de muestras analizadas. (Prieto 2002)

### **2.3 Marco conceptual.**

Para efectos de la presente investigación, se tienen las siguientes definiciones:

**La identificación genética humana.** Considerada como una técnica para distinguir a los individuos dentro de una misma especie utilizando muestras de su ADN. La técnica se basa en que dos seres humanos tienen una gran parte de su secuencia de ADN en común y para distinguir a dos individuos se puede explotar la repetición de secuencias altamente variables.

**El ADN (ácido desoxirribonucleico).** El cual está constituido por dos cadenas largas de nucleótidos que forman una doble hélice, cada una conformada por una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Citosina y Timina), una molécula de azúcar de cinco carbonos (pentosa) y una molécula de ácido fosfórico, unidas mediante enlaces de hidrógeno en forma complementaria.

**El ADN óptimo.** Considerado como la molécula de ADN presente en las células en la cantidad suficiente, en tamaño adecuado y libre de compuestos inhibidores a los exámenes genético moleculares.

**El ADN crítico.** Considerado como la molécula de ADN presente en las células, en la cantidad insuficiente, en tamaño no adecuado y con presencia de compuestos inhibidores a los exámenes genético moleculares.

**Ausencia de ADN.** Se refiere a la ausencia de la molécula en las muestras biológicas analizadas y/o en cantidades no perceptibles por los diversos métodos de análisis.

**Escasez de ADN.** Referido a la presencia de la molécula en las muestras biológicas analizadas en cantidades por debajo de las mínimas requeridas para los estudios genético moleculares.

**Degradación de ADN.** Cuando se habla de ADN degradado se hace referencia al material genético que, por acción, generalmente bacteriana, sufre fragmentación de forma inespecífica por causa de las nucleasas.

**Inhibidores de ADN.** Los inhibidores de la PCR son contaminantes orgánicos e inorgánicos incluidos en la muestra de ADN que interfieren atenuando o inhibiendo completamente la reacción de amplificación por PCR.

**Muestras biológicas.** Son la fuente viva que contiene el material genético molecular, en la cual se encuentra el depósito de la información sobre las características genéticas de cada individuo

**La sangre.** Es un tejido conjuntivo, que circula por el corazón, las venas, arterias y capilares, posee ciertas características como el color rojo, la consistencia viscosa y su capacidad coagulable, que lo distingue de otros tejidos corporales.

**Mancha de sangre.** Es la alteración del color en una superficie, originada por la sangre, a medida que transcurre el tiempo mostrarse o como una mancha.

**Pruebas de orientación.** Son aquellas que nos revelan el origen y/o naturaleza de la mancha, pero no son de todas certeras; por lo que solo sirven para descartar la naturaleza de estas.

**Pruebas de individualización.** Son aquellas que nos permiten individualizar al agente que dio origen a la mancha, presentan diversos grados de certeza, dependiendo de su tipo, siendo las pruebas genéticas las de mayor grado.

**Perfil genético.** Se denomina perfil genético a una serie de números (alelos), que son característicos en cada individuo, en referencia a una serie de fragmentos de ADN llamados marcadores genéticos.

**Perfil genético parcial.** Considerado este como aquel que no presenta alelos en la totalidad de todos los marcadores genéticos analizados.

**Perfil genético no amplificado.** Se hace referencia a este como aquel en el que no se ha logrado obtener ningún alelo en los marcadores genéticos analizados.

## **2.4 Objetivos e hipótesis.**

### **2.4.1 Objetivos.**

#### **2.4.1.1 Objetivo general.**

Determinar en qué medida el Perfil Genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas.

#### **2.4.1.2 Objetivos específicos.**

1. Determinar en qué medida la no amplificación del Perfil Genético se relaciona con la ausencia del ADN crítico en las muestras biológicas.
2. Determinar en qué medida la no amplificación del Perfil Genético se relaciona con la escasez del ADN crítico en las muestras biológicas.
3. Determinar en qué medida la no amplificación del Perfil Genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológicas.
4. Determinar en qué medida el Perfil Genético Parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas.

## **2.4.2 Hipótesis.**

### **2.4.2.1 Hipótesis general.**

El Perfil genético se relaciona en gran medida con el ADN crítico de las muestras biológicas.

### **2.4.2.2 Hipótesis específicas.**

1. La no amplificación del perfil genético se relaciona con la ausencia del ADN crítico en las muestras biológicas remitidas.
2. La no amplificación del perfil genético se relaciona con la escasez del ADN crítico en las muestras biológicas remitidas.
3. La no amplificación del perfil genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológicas remitidas.
4. El perfil genético parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas remitidas.

## **Capítulo 3: Diseño Metodológico.**

### **3.1 Tipo y diseño de investigación.**

#### **3.1.1 Tipo de investigación.**

Descriptiva - Cuantitativa - Transversal.

El presente estudio es del tipo Descriptivo, debido a que se dirige fundamentalmente a la descripción de fenómenos en una circunstancia temporal y especial determinada (Cortés and Iglesias 2005).

Este tipo de estudio busca especificar las propiedades importantes de un fenómeno que es sometido a análisis. Seleccionando una serie de cuestiones que posteriormente serán medidos de forma independiente, de forma tal que se podrá describir lo que se investiga. Este tipo de estudio puede ofrecer la posibilidad de llevar a cabo algún nivel de predicción (aunque sea elemental). Consiste fundamentalmente en caracterizar un fenómeno o situación concreta indicando sus rasgos más peculiares o diferenciadores (Cortés and Iglesias 2005).

La presente investigación presenta un enfoque cuantitativo, debido a que toma como foco de su proceso en la investigación datos numéricos, este proceso utiliza la observación como forma de recolectar datos y los analizan para poder llegar a responder a todas las preguntas que forman parte del fondo de la investigación. Estos procedimientos engloban la recolección, la medición de parámetros, la obtención de frecuencias absolutas y/o relativas y estadísticas poblacionales que son parte de la

investigación para llegar a obtener la correspondiente prueba de hipótesis. Este enfoque requiere necesariamente el análisis estadístico, una vez establecida la idea de fondo de la investigación, se debe de formular las preguntas de investigación adecuadas, se deben de establecer los objetivos del mismo, debemos derivar las hipótesis correspondientes, elegir las variables del estudio y mediante un proceso de cálculo estadístico se debe de contrastar las correspondientes hipótesis. Este enfoque es muy utilizado en estos procesos, gracias a la naturaleza de estas las cuales puedan ser medibles y/o cuantificables (Cortés and Iglesias 2005).

En este tipo de investigación, de un fondo transversal, se van a recolectar los datos obtenidos en un solo momento, es decir en un tiempo único. Dentro de sus propósitos están el describir las variables y analizarlas, tanto en su incidencia e interrelación en un momento dado y/o establecido. Este tipo de investigaciones se les consigna la figura de verse como una fotografía de momento, es decir una toma dada en el momento del desarrollo del problema de investigación. (Cortés and Iglesias 2005)

### **3.1.2 Diseño de investigación.**

Descriptivo - Analítico.

Indicado ya el objetivo de la investigación de tipo descriptiva, debemos mencionar que su meta no solo se limita a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables. Los investigadores no son meros tabuladores, sino que recogen los datos sobre la base de una hipótesis o teoría, exponen y resumen la información de manera cuidadosa y luego analizan



minuciosamente los resultados, a fin de extraer generalizaciones significativas que contribuyan al conocimiento (Cortés and Iglesias 2005).

## **3.2 Variables.**

### **3.2.1 Variable independiente.**

El ADN crítico de las muestras biológicas.

### **3.2.2 Variable dependiente.**

Perfil genético.

## **3.3 Población, muestra y muestreo.**

### **3.3.1 Población.**

La población -a veces llamada universo o agregado- constituye siempre una totalidad. Las unidades que la integran pueden ser individuos, hechos o elementos de otra índole. Una vez identificada la población con la que se trabajará, entonces se decide si se recogerán datos de la población total o de una muestra representativa de ella. El método elegido dependerá de la naturaleza del problema y de la finalidad para la que se desee utilizar los datos. Población total: Muchas veces no es difícil obtener información acerca de todas las unidades que componen una población reducida, pero los resultados no pueden aplicarse a ningún otro grupo que no sea el estudiado (Cortés and Iglesias 2005).

En nuestro estudio la población total estuvo constituida por 800 muestras biológicas con resultado positivo a la prueba de orientación de alta sensibilidad, Bluestar, remitidas a la Sección de Biología y Genética Molecular, del Departamento de Biología

Forense de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú durante los años 2008 al 2018.

### **3.3.2 Muestra.**

Muestra de la población: Cuando se trata de una población amplia se recoge la información a partir de unas pocas unidades cuidadosamente seleccionadas, ya que, si se aborda cada grupo, los datos perderían vigencia antes de concluir el estudio. Si los elementos de la muestra representan las características de la población, las generalizaciones basadas en los datos obtenidos pueden aplicarse a todo el grupo (Cortés and Iglesias 2005).

La unidad de estudio en nuestro trabajo de investigación estuvo constituida por cada una de las muestras biológicas que resultaron positivas a la prueba de Bluestar, remitidas a la Sección de Biología y Genética Molecular, del Departamento de Biología Forense de la Dirección de Criminalística de la Policía Nacional del Perú durante los años 2008 al 2018.

### **3.3.3 Muestreo.**

El muestreo se refiere a la selección de un conjunto de elementos y/o unidades muestrales, las cuales son consideradas como muestras adecuadas para el logro del objetivo establecido a partir de la obtención de la información necesaria y/o deseada a partir de la población en estudio. En el muestreo de tipo probabilístico todos los elementos y/o unidades muestrales tienen la misma probabilidad de ser elegidos. Para la realización de un muestreo probabilístico es necesario determinar el tamaño de la

muestra adecuada (n) y seleccionar los elementos muestrales, que formaran parte del estudio de una manera en la que todos tengan la misma probabilidad de ser elegidos. Dentro de este tipo de muestreo tenemos al muestreo aleatorio simple o llamado también muestreo al azar, que es la forma más usada para obtener una muestra considerada representativa. Para conseguir la certeza de que cada uno de los individuos de la población sean elegidos aleatoriamente durante el proceso del muestreo es necesario emplear tablas numéricas, las cuales contienen números aleatorios, estas tablas se pueden encontrar anexados a los libros de estadística o también se pueden emplear programas estadísticos como el R, InfoStat, StataSE, entre otros. Consiste en seleccionar un grupo de n unidades muestrales de tal manera que cada muestra de tamaño n tenga la misma oportunidad de ser seleccionada. La fórmula empleada para determinar tamaño de muestra (con variantes si se trata de una población finita o infinita), es:

$$n = \frac{Z^2 * N * p * q}{e^2 * (N-1) + (Z^2 * p * q)}$$

Donde:

Z = Nivel de confianza (correspondiente con tabla de valores de Z)

p = Porcentaje de la población que tiene el atributo deseado.

q = Porcentaje de la población que no tiene el atributo deseado = 1-p.

Nota: cuando no hay indicación de la población que posee o no el atributo se asume 50% para p y 50% para q.

N = Tamaño del universo (se conoce puesto que es finito)

e = Error de estimación máximo aceptado.

n = Tamaño de muestra.

La técnica de muestreo empleada para el presente estudio fue el muestreo aleatorio simple. Se realizaron los cálculos considerando una distribución normal para una población finita, con un nivel de confianza del 95% y un error de 5%.

Teniendo como resultado un tamaño de muestra 260.

### **3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.**

#### **3.4.1 Técnicas de recolección de datos.**

Guía documental.

Una guía documental permite conocer la importancia de la documentación en todo proceso investigador, ofrece además un panorama transcultural, histórico y bibliográfico del tema objeto de estudio; permite una amplia visión de la realidad en cuanto a áreas de investigación, autores más relevantes, métodos de análisis, entre otros.

Los objetivos que la guía documental debe perseguir son: 1.- Definir y delimitar el área de interés. 2.- Conocer los tipos de documentos que existen y la documentación que pueden aportar. 3.- Aportar marcos teóricos sobre el tema. 4.- Obtener una bibliografía relevante y actualizada que evite la duplicación de datos. 5.- Posibilitar el acceso a disciplinas relacionadas con el tema que se investiga.

Para conseguir estos objetivos debe conocerse previamente: a) El Centro o Centros de Documentación. b) Bancos de Datos respecto al tema. c) Descriptores y Palabras Clave. d) Tipos de documentos e información que aportan. El contenido de la guía documental viene dado siempre por el criterio de autor, ya que por sí misma puede recoger cualquier tipo de documento, aunque su pretensión debe ser abarcar aquellos que permitan un exhaustivo examen documental.

Operación que consiste en examinar un documento para encontrar sus elementos esenciales y las relaciones entre ellos.

#### **3.4.2 Instrumentos de recolección de datos.**

Se refiere a cualquier tipo de recurso que utiliza el investigador; para allegarse de información y datos relacionados con el tema de estudio. Por medio de estos instrumentos, el investigador obtiene información sintetizada que podrá utilizar e interpretar en armonía con el marco teórico. Los datos recolectados están íntimamente relacionados con las variables de estudio y con los objetivos planteados.

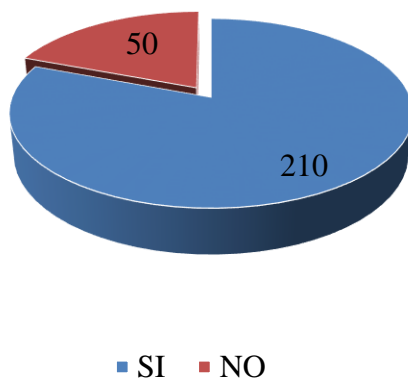
En la presente investigación el instrumento de recolección de datos fue la ficha de análisis documentario.

#### **3.5 Técnicas para el procesamiento de datos.**

Hojas de datos – Microsoft Office Excel para registrar las frecuencias absolutas y cálculos de las frecuencias relativas y para la prueba de independencia del Chi Cuadrado.

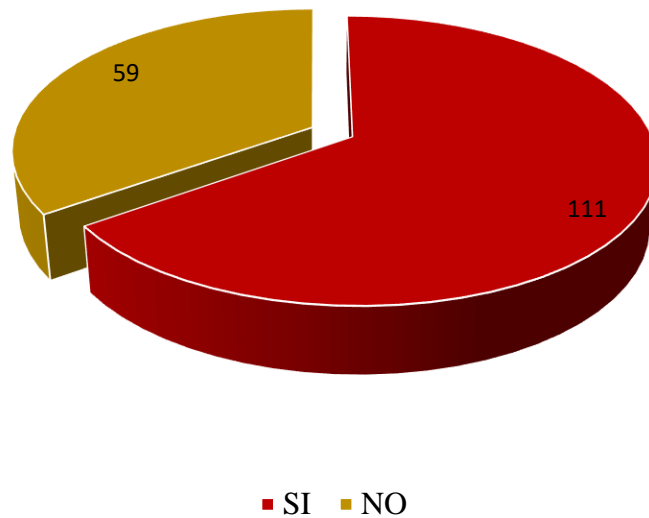
## Capítulo 4: Análisis y discusión de resultados.

### 4.1 Análisis de resultados.



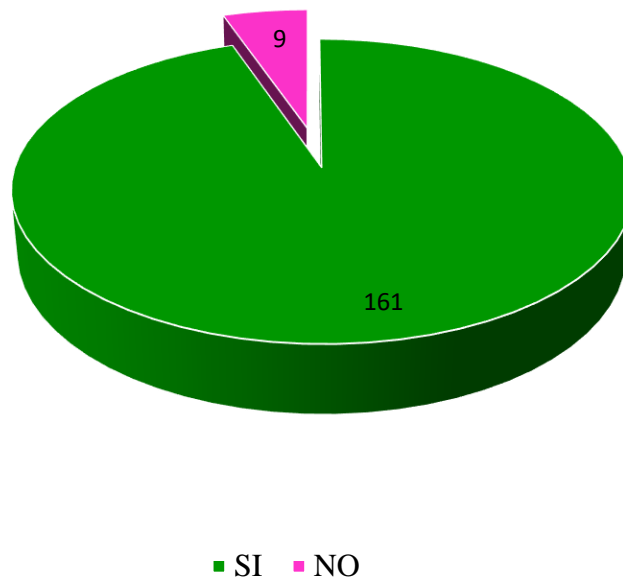
*Figura 5: Relación del perfil genético con el ADN crítico de las muestras biológicas.*

Con el objetivo general de determinar en qué medida la obtención de un perfil genético óptimo se relaciona con el ADN crítico presente en las muestras biológicas, se analizaron los resultados obtenidos en 260 muestras con resultado positivo a la prueba de Bluestar, remitidas a la Sección de Biología y Genética Molecular, durante los años 2008 al 2018. Como se observa en la figura, en 210 de estas muestras se determinó la existencia de características y/o condiciones propias del ADN crítico, cuya presencia influyó en la obtención de perfiles genéticos. Mientras que los resultados de las 50 muestras biológicas restantes, no mostraron ninguna presencia propia de la condición crítica del ADN.



*Figura 6. Relación de la no amplificación del perfil genético con la ausencia de ADN crítico de las muestras biológicas.*

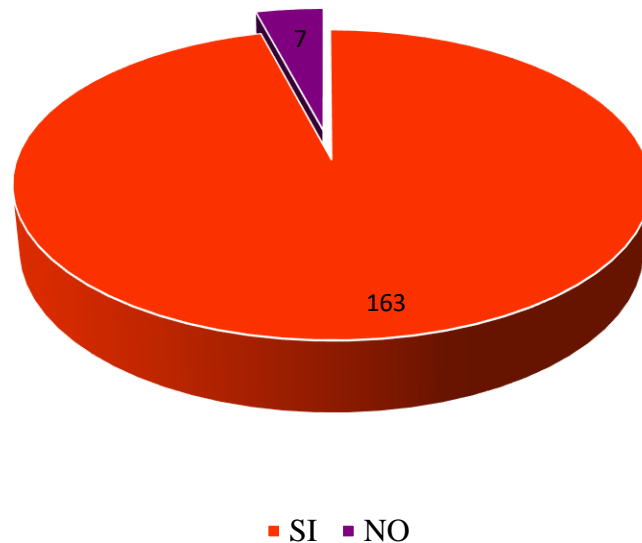
Siguiendo con los objetivos específicos, se analizaron las 210 biológicas, encontrándose que en 170 de las ellas no se logró amplificar ningún perfil genético; en el análisis profundo de éstos se llegó a determinar que la ausencia del ADN crítico en 111 muestras se relaciona con la no amplificación del perfil genético en forma completo, mientras que en 59 de las muestras no se llegó a determinar la razón de la no amplificación del perfil genético indicado.



*Figura 7. Relación de la no amplificación del perfil genético con la escasez del ADN crítico de las muestras biológicas.*

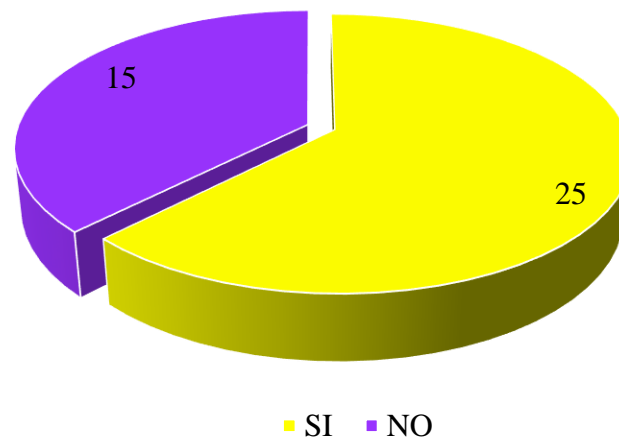
Del mismo modo siguiendo con los objetivos específicos mencionados, las 170 muestras biológicas fueron analizadas, llegándose a determinar que, en 161 de ellas, la escasez del ADN crítico es la causa de la no amplificación de un perfil genético completo, mientras que en 9 de las muestras no se llegó a determinar la razón de la no amplificación del perfil genético indicado.





*Figura 8. Relación de la no amplificación del perfil genético con la inhibición del ADN crítico de las muestras biológicas.*

Siguiendo con el análisis, se determinó que de las 170 muestras biológicas con ADN crítico analizadas, 163 muestras revelan la presencia de inhibidores la cual se relaciona con la no amplificación de un perfil genético completo, mientras que en 7 de ellas no se llegó a determinar la razón de la no amplificación del perfil genético indicado.



*Figura 9. Relación de la obtención del perfil genético parcial con la degradación de ADN crítico de las muestras biológicas.*

Finalmente se analizaron las 40 muestras biológicas con el ADN crítico restantes, las cuales presentaban un perfil genético parcial; obteniéndose que 25 de ellas contenían degradación en el ADN. Mientras que en 15 de ellas no se logró determinar alguna relación con los índices de degradación del material genómico.

Tabla 2. Frecuencia de perfiles genéticos de las muestras biológicas en relación con la condición del ADN.

CONDICIONES DEL ADN	PERFIL GENÉTICO			TOTAL
	COMPLETO	INCOMPLETO	NO AMPLIFICADO	
<b>ÓPTIMAS</b>	50	00	00	50
<b>CRÍTICAS</b>	00	40	170	210
<b>TOTAL</b>	50	40	170	260

95% de Confianza y  $\alpha = 0.5$

X-squared = 260, df = 2, p-value < 2.2e-16

H0: El Perfil Genético (Completo, Incompleto y No Amplificado) es independiente de la condición del ADN (Óptima y Crítica).

H1: El Perfil Genético (Completo, Incompleto y No Amplificado) NO es independiente de la condición del ADN (Óptima y Crítica).

De un total de 260 muestras biológicas procesadas en la Sección de Biología y Genética Molecular se logró obtener 50 perfiles genéticos completos, 40 perfiles genéticos en forma incompleta y en 170 de ellas, el material genético no pudo ser amplificado. De este total, en 50 de ellas el ADN se encontraba en condiciones óptimas, mientras que en los 210 restantes el AND se encontraba en condiciones críticas. Como el p-value (2.2e-16) es menor a 0.5, se rechaza la independencia; por lo que estadísticamente se puede afirmar que la determinación de los perfiles genéticos en las muestras biológicas remitidas está relacionada con la condición del ADN (Óptima y Crítica).

## 4.2 Discusión.

La obtención de un perfil genético, que permita la identificación plena del individuo aportante del material genómico, está estrechamente relacionado con la condición en la que se encuentra la molécula del ADN en la muestra analizada; debido a que como lo señaló Villalobos (2013) el perfil genético no es más que un conjunto ordenado de fragmentos de ADN de tamaño específico. En nuestro caso los kits de amplificación utilizados en los procedimientos de laboratorio como son el PowerPlex® 16 HS System y el AmpFISTR® Identifier® Plus, están constituidos por 16 marcadores genéticos cada uno, incluida la amelogenina que determina el sexo, dentro de estos Kits los tamaños de los marcadores genéticos no superan los 360 pares de base (pb), permitiendo así la amplificación simultánea de estos 16 marcadores y la recuperación de información de muestras en las que el ADN presenta condiciones críticas. En nuestro estudio se analizaron los resultados obtenidos en 260 muestras biológicas, de las cuales solo 50 mostraron perfiles genéticos útiles para la identificación plena del individuo aportante del material biológico, mientras que, en 210 muestras, equivalente al 80.8%, se obtuvo perfiles genéticos parciales o en su defecto no se obtuvo amplificación alguna del material genético presente en estas muestras. Lo que nos indica que el ADN recuperado en este tipo de muestras, se encontraba en condiciones críticas, las cuales son reflejadas en la tipificación de los fragmentos de ADN a través de la electroforesis capilar. Entre las principales causas de esta condición tenemos la ausencia de material genómico, la escasez de éste, los altos índices de degradación y/o la presencia de inhibidores que afectan el proceso de amplificación a través de la técnica de la PCR.

En la actualidad, dentro de las pruebas de orientación de alta sensibilidad, el reactivo del Bluestar® Forensic, constituye la prueba con mayores índices de frecuencia de uso, debido a que en comparación a su antecesor, el Luminol, presenta peculiaridades que ayudan la conservación y disminuyen el daño del material genético presente en las muestras recuperadas a partir de su aplicación (Giraldo et al. 2013); además la mayor perdurabilidad de la fluorescencia, hace que el investigador en la escena del crimen logre identificar y visualizar en mejor manera las manchas latentes, disminuyendo con ésta las incidencias de los resultados falso positivos (Arbeláez and Ríos 2009). No obstante, dentro de nuestro sistema criminalístico, existe falencias y deficiencias, en diversos puntos del procedimiento que involucra la recuperación de indicios biológicos de manchas latentes. La falta de entrenamiento de los operadores en el sistema descentralizado, podría conducir a un incremento en la recuperación de manchas latentes con resultados falso positivos, los cuales son evidenciados posterior a las pruebas de confirmación y/o individualización (Santos J.E. 2011). Así mismo, la ruta que se sigue durante el envío de las muestras al laboratorio de referencia, juegan un papel importante en la conservación del material biológico recuperado, una inadecuada remisión de las muestras, facilita la degradación total del material genómico, por los microorganismos, en especial las bacterias (Martínez 1999); condición que al análisis posterior resulta evidenciado una ausencia de material genético necesario para la obtención de perfiles genéticos. Del mismo modo la técnica de extracción y purificación del ADN empleado, suma o minoriza la cantidad de ADN recuperado de este tipo de muestras en un procedimiento inicial; posteriormente, la presencia de material genético por debajo de los

umbrales de detección, necesarias para la amplificación es otra de las causas por las que las cuales no se logra obtener ningún perfil genético. En el análisis de nuestras muestras de estudio, la ausencia de material genético presenta una frecuencia relativa de 65.3% (111) de ocurrencia haciéndonos pensar que esta condición crítica es una de las causantes de este fenómeno.

Para la amplificación exitosa de los fragmentos de ADN de cada marcador genético molecular, se requieren de ciertas cantidades de ADN, las cuales dependerán del Kit de amplificación empleado, oscilando estos valores en un rango de 0.5 a 1.0 ng/ $\mu$ l. Para garantizar la recuperación de esta cantidad mínima de ADN en las muestras biológicas analizadas, se recurren a diferentes procesos de extracción y purificación; en nuestra sección este proceso es llevado a cabo mediante la extracción Orgánica (Fenol - Cloroformo - Alcohol isoamílico) y recientemente se ha incorporado la extracción y purificación mediante Kits Comerciales, que emplean resinas para la recuperación máxima de moléculas de ADN. Al tratarse las muestras de estudio, aquellas consideradas como latentes y en las que existen altas probabilidades de daño en el material genético, es conveniente realizar la extracción y purificación del material genómico a través del empleo de los Kits comerciales, más ello no siempre es posible debido a la falta de abastecimiento de insumos y reactivos, para estos procedimientos. Una vez que se tienen soluciones acuosas con material genómica suspendido, se deben llevar al procedimiento de cuantificación. La cuantificación en nuestra sección es llevada a cabo mediante la espectrofotometría, la cual nos permite determinar el espectro de absorbancia del DNA, en un rango de 230 a 340 nm, la desventaja de esta técnica radica en la no discriminación

de material genómico humano y no humano, presente en la solución; así, mismo no nos muestra la proporción de material genético óptimo para los procedimientos de amplificación. Actualmente, la cuantificación mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), es uno de los procedimientos que caracterizan al ADN en forma cuantitativa y cualitativamente, permitiéndonos conocer no solo la cantidad del ADN presente, sino la condición en la que éste encuentra, evidenciando los índices de fragmentación, la presencia de inhibidores, entre otros. Siendo este, uno de los procedimientos recomendados para la etapa de caracterización cuantitativa y cualitativa de la molécula de ADN recientemente extraída.

Además, se debe mencionar que si no se llega a la cantidad mínima requerida para la amplificación pueden emplearse técnicas de concentración de ADN para incrementar las cantidades del mismo, pero en este tipo de muestras a veces este procediendo se hace imposible debido a que los volúmenes de elución son muy reducidos, y estas técnicas requieren volúmenes grandes de elución.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el procedimiento de la cuantificación, tanto por espectrofotometría y/o qPCR, nos muestran que en 161 muestras analizadas que equivale a un 94.7%, la escasez del ADN crítico en las muestras biológicas es la causa por la cual no se pudo obtener un perfil genético.

La determinación de perfiles genéticos, en muestras con características críticas, se deben en gran parte a la incorporación de la técnica de la PCR, por lo que la presencia de inhibidores que afecte cualquiera de los pasos en el desarrollo de esta técnica, es la causa

principal por la cual no se logran obtener perfiles genéticos. En la lista de importantes inhibidores que pueden estar presentes en este tipo de muestras tenemos a la hematina, que paradójicamente es uno de los componentes mayoritarios presentes en la sangre, y constituye el principal componente biológico recuperado en las escenas de los crímenes sangrientos gracias a la aplicación del reactivo del Bluestar. Seguido a este, tenemos al ácido húmico, componente propio del suelo, el cual afecta el acoplamiento de la Taq polimerasa en la etapa de elongación; en menos frecuencia tenemos al Dithiothreitol (DTT), el alcohol, entre otros; tal como lo señala Martínez (1999).

En nuestro caso no se sabe exactamente la presencia de qué inhibidor ha afectado la obtención de los resultados buscados. Pero en general, es la presencia de estos inhibidores la causa de la no amplificación del perfil genético en las muestras biológicas analizadas. Se encontró frecuencias de ocurrencia en 163 muestras analizadas, haciendo un equivalente del 95.9 %.

Un perfil genético parcial, es aquel perfil en el que no se ha logrado tipificar todos los marcadores genéticos moleculares, incluidos en el Kit de amplificación usado, este suceso es común evidenciarlo en aquellas muestras biológicas en las que el material genético ha sufrido degradación.

Como lo señalado por Lorente, la degradación puede darse por acción, generalmente bacteriana, por lo que el ADN sufre fragmentación de forma inespecífica por causa de las nucleasas.



El análisis de las muestras de nuestro estudio evidencia una relación entre la obtención de un perfil genético parcial y la degradación del material genómico en un 62.2% (25).

## Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones.

### 5.1 Conclusiones.

1) La obtención del perfil genético en las muestras biológicas analizadas se relaciona positivamente en un 80.8% (210) con la presencia del ADN crítico en las muestras biológicas.

2) La no amplificación del perfil genético en las muestras biológicas analizadas se relaciona en un 65.3% (111) con la ausencia del ADN crítico en las muestras biológicas.

3) La no amplificación del perfil genético en las muestras biológicas analizadas se relaciona en un 94.7% (161) con la escasez del ADN crítico en las muestras biológicas.

4) La no amplificación del perfil genético en las muestras biológicas analizadas se relaciona en un 95.9 % (163) con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológicas.

5) La obtención de un perfil genético parcial en las muestras biológicas analizadas se relaciona en un 62.2% (25) con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas.

6) Estadísticamente (p-value:  $2.2e-16$ ) se comprobó que la condición óptima y/o crítica del ADN se relaciona con la obtención de un perfil genético (completo, incompleto o no amplificado).

## 5.2 Recomendaciones.

1) Debido a que la obtención de un perfil genético se relaciona con la condición crítica del ADN presente en las muestras biológicas, es recomendable establecer protocolos específicos para este tipo especial de muestras. Desde la aplicación de las pruebas de orientación hasta la elección de la técnica de tipificación.

2) Para disminuir las tasas de incidencia de los resultados falsos positivos, se deben iniciar cursos de capacitación y perfeccionamiento en la aplicación de reactivos de alta sensibilidad, y la correcta interpretación de los resultados.

3) Así mismo, al comprobar que la escasez del ADN crítico en las muestras biológicas tiene estrecha relación con la no amplificación del perfil genético, es de suma importancia estandarizar los protocolos de extracción y purificación del ADN en este tipo de muestras.

4) El uso de Kits de amplificación de reciente tecnología logra minorizar los efectos de la presencia de inhibidores en este tipo de muestras, por lo que es recomendable la incorporación de reactivos de nueva generación a los procedimientos seguidos en el laboratorio.

5) Siendo las bacterias, el principal agente biológico; y la temperatura y la humedad, agentes físicos; los que se encuentran relacionados con la degradación del ADN; se recomienda la elaboración de guías e instrucciones a seguir desde la toma de muestra, secado, embalado y envío del mismo al laboratorio de referencia.

### Referencias Bibliográficas

- Arbeláez, Luisa, and Linda Ríos (2009). Validación de Los Métodos Bluestar Forensic Free y Thevenon Roland-Piramidón Como Pruebas Preliminares En La Investigación de Sangre de Interés Forense. Pontificia Universidad Javeriana.
- Builes Gómez, Juan, Jorge Rodriguez, Alba Montoya, et al. (2005). A Peruvian Population Study of Eight Y-Chromosome STR Loci. *Journal of Forensic Sciences* 50: 959–61.
- Builes, J. J., J. Hau, J. I. Rodríguez, et al. (2006). Peruvian Population Study with 16 Y-STR Loci. *International Congress Series* 1288. *Progress in Forensic Genetics* 11: 216–218.
- Butler J. (2010). *Fundamentos de La Tipificación Forense de ADN*.
- Butler, John M. (2015). The Future of Forensic DNA Analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 370(1674).
- Comité Estadístico Interinstitucional de la Criminalidad. (2018). Perú: Anuario Estadístico de La Criminalidad y Seguridad Ciudadana. 2011-2017. Instituto Nacional de Estadística e Informática.
- Cortés, Manuel E, and Miriam Iglesias. (2005). *Generalidades sobre metodología de la investigación*. Ciudad del Carmen, Camp.: Universidad Autónoma del Carmen.
- Dumache, Raluca, Veronica Ciocan, Camelia Muresan, and Alexandra Enache. (2016). Molecular DNA Analysis in Forensic Identification. *Clinical Laboratory* 62(1–2): 245–248.

- Edwards, A, A Civitello, HA Hammond, and CT Caskey. (1991). DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *American Journal of Human Genetics* 4(49): 746–56.
- García, Doris. (2008). *Manchas de Sangre*. Perú: Universidad Tecnológica del Perú.
- Geserick, Gunther, and Ingo Wirth. (2012). Genetic Kinship Investigation from Blood Groups to DNA Markers. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 39(3): 163–175.
- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, and Buckleton J. (2000). Una Investigación Del Rigor de Las Reglas de Interpretación Para Los STR Derivados de Menos de 100 Pg de ADN. *Ciencia Forense* (112): 17–40.
- Gill, P., J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, and J. Buckleton. (2000). An Investigation of the Rigor of Interpretation Rules for STRs Derived from Less than 100 Pg of DNA. *Forensic Science International* 112(1): 17–40.
- Giraldo, Eliana, Tatiana Espinosa, Nataly Lezcano, et al. (2013). Efecto Del Bluestar Forensics® Sobre Las Pruebas Preliminares y de Analisis de ADN En La Investigación de Manchas de Sangre. *Revista Facultad de Ciencias Forenses y de La Salud* 9: 9–21.
- Hernández, Alejandra Wendoly, and Flor de María Trejo. (2014). Genetic Population Study of Allelic Frequencies on 15 STR's Markers in the Estate of Zacatecas Applied on Forensic Practice. *¡MedPub Journals* 10(1:1): 1–24.

- Jeffreys, A J, V Wilson, S L Thein, D J Weatherall, and B A Ponder. (1986). DNA “Fingerprints” and Segregation Analysis of Multiple Markers in Human Pedigrees. *American Journal of Human Genetics* 39(1): 11–24.
- Jeffreys, A, V Wilson, and S Thein. (1985). Individual-Specific ‘Fingerprints’ of Human DNA. *Nature* (316): 76–79.
- Landsteiner, karl. (1900). Zur Kenntnis Der Antifermentativen, Lytischen Und Agglutinierenden Wirkung Des Blutserums Und Der Lymphe. *Zentralblatt Für Bakteriologie* 1(27). 10-11: 357–362.
- Lorente, José Antonio. (2004). *Un Detective Llamado ADN*. 1st edition. España, Madrid: Temas de hoy.
- Luque J. A., and Herraiz A. (2001). *Organización Del Genoma Eucariotico, Clonación Acelular, Reacción En Cadena de La Polimerasa (PCR), Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Harcourt. Madrid.
- Machado, Helena, and Susana Silva. (2019). What Influences Public Views on Forensic DNA Testing in the Criminal Field? A Scoping Review of Quantitative Evidence. *Human Genomics* 13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6533668/>, accessed September 1, 2019.
- Maciejewska, Agnieszka, Joanna Jakubowska, and Ryszard Pawłowski 2013 Whole Genome Amplification of Degraded and Nondegraded DNA for Forensic Purposes. *International Journal of Legal Medicine* 127(2): 309–319.
- Martínez, Begoña. (1999). *La Prueba Del ADN En Medicina Forense*. España, Barcelona.: Masson S.A.

- Mautner, Martín E., Agustín Pérez Santángelo, Rodrigo M. Corti Bielsa, et al. (2017). Using Long SsDNA Polynucleotides to Amplify STRs Loci in Degraded DNA Samples. PLoS ONE 12(11).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669423/>, accessed August 17, 2019.
- Mayr, Wolfgang. (1971). Die Genetik Des HL-A-Systems. Populations-Und Familienuntersuchungen, Unter Besonderer Berücksichtigung Der Paternitätsserologie. Humangenetik. 12: 195–199.
- Mullis, K, R Saiki, D Gelfand, et al. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science (239): 487–491.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2013). Estudio Mundial Sobre El Homicidio.
- Ohno S. (1972). Evolutional Reason for Having so Much Junk DNA. Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Orgel LE, and Crick FHC. (1980). Selfish DNA: The Ultimate Parasite. Nature 284(604607).
- Pérez, Lizandrina, Jorge Hau, Félix Izarra, et al. (2003). Allele Frequencies for the 13 CODIS STR Loci in Peru. Forensic Science International 132(2): 164–165.
- Prieto, Lourdes. (2002). Estudio de Polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados. Memoria, universidad Complutense de Madrid.

- Roewer, Lutz. (2013). DNA Fingerprinting in Forensics: Past, Present, Future. *Investigative Genetics* 4: 22.
- Santos J.E. (2011). Análisis Reconstructivo Forense Por Patrones de Manchas de Sangre. Grupo Editorial Cromeo S.A.C.
- Smit AF. (1999). Interspersed Repeats and Other Mementos of Transposable Elements in Mammalian Genomes (9): 657-663.
- Villa, Mónica M., Juan D. Granda, Leonor Gusmão, and Adriana A. Ibarra. (2017). Variation of the genetic profiles obtained by PCR with and without DNA extration from blood stain. *Actualidades Biologicas* 39(106): 79–87.
- Villalobos, Héctor. (2017). Las Pruebas de AND en el Contexto Forense. *Revista de Ciencias Forenses de Honduras* 2(3): 27–37.
- Watson, J, and F Crick. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* (171): 737–738.
- Weber JL, and May PE. (1989). Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction (44): 388–396.
- Yang, Yaran, Bingbing Xie, and Jiangwei Yan. (2014). Application of Next-Generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 12(5): 190–197.
- Zupanič, I, B Gornjak, and J Balažic. (2010). Molecular Genetics Identification of Skeletal Remains of World War I Konfin Mass Grave in Slovenia. *International Journal of Legal MedicineCroatian Medical Journal* (124): 307–317.



Zupanič, I, H Sterlinko, J Balaic, and R Komel. (2001). Paternity Testing and Filing with 14 Locus STR Data 5 STR in the Population of Slovenia. *International Journal of Legal Medicine* Croatian Medical Journal 3(114): 178–180.

## ANEXOS

## 01 Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES				METODOLOGIA
<p>GENERAL</p> <p>¿En qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas?</p>	<p>GENERAL</p> <p>Determinar en qué medida el perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras.</p>	<p>GENERAL</p> <p>El perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas.</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <p>ADN crítico de las muestras biológicas.</p>	<p>DEFINICION CONCEPTUAL</p> <p>El ADN crítico es la molécula del ADN que, por la antigüedad, la exposición a insumos químicos y/o a condiciones físicas se encuentra deteriorado o en mínimas cantidades dentro del núcleo.</p> <p>Las muestras biológicas son cualquier material de origen humano y no humano susceptible de análisis y conservación.</p>	<p>DEFINICION OPERACIONAL</p> <p>El ADN crítico es la molécula del ADN que, por la antigüedad, la exposición a insumos químicos y/o a condiciones físicas se encuentra deteriorado o en mínimas cantidades dentro de las células sanguíneas de las muestras biológicas de origen humano, recolectadas con pruebas de Bluestar.</p>	<p>DIMENSIONES</p> <p>Cantidad del ADN crítico.</p> <p>Calidad del ADN crítico.</p>	<p>INDICADORES</p> <p>La cantidad del ADN crítico se medirá como ADN ausente o escaso.</p> <p>La calidad del ADN crítico se medirá como ADN degradado, contaminado o inhibido.</p>	<p>TIPO DE INVESTIGACION</p> <p>Descriptiva</p> <p>Cuantitativa</p> <p>Transversal</p>

<p>ESPECIFICOS</p> <p>¿En qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la ausencia de ADN crítico en muestras biológicas?</p> <p>¿En qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la escasez de ADN crítico en las muestras biológicas?</p> <p>¿En qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológicas?</p>	<p>ESPECIFIOS</p> <p>1. Determinar en qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la ausencia de ADN crítico en muestras biológicas.</p> <p>2. Determinar en qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la escasez de ADN crítico en muestras biológicas.</p> <p>3. Determinar en qué medida la no amplificación del perfil genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en muestras biológicas.</p>	<p>ESPECIFICOS</p> <p>1. La no amplificación del perfil genético se relaciona con la ausencia de ADN crítico en muestras biológicas.</p> <p>2. La no amplificación del perfil genético se relaciona con la escasez de ADN crítico en las muestras biológicas.</p> <p>3. La no amplificación del perfil genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológica.</p>	<p>VARIABLE DEPENDIENTE</p> <p>Perfil genético</p>	<p>DEFINICION CONCEPTUAL</p> <p>El perfil genético es un patrón de fragmentos cortos de ADN ordenados de acuerdo a su tamaño que son característicos de cada individuo.</p>	<p>DEFINICION OPERACIONAL</p> <p>Perfil genético con un conjunto de 16 marcadores moleculares propios de cada kit de amplificación que caracterizan a cada individuo.</p>	<p>DIMENSIONES</p> <p>Perfil genético parcial</p> <p>Perfil genético no amplificado</p>	<p>INDICADORES</p> <p>El perfil genético parcial, será el que presente alelos menos de 16 marcadores moleculares analizados.</p> <p>El perfil genético no amplificado, será el que presente menos de 12 marcadores moleculares.</p>	<p>DISEÑO DE INVESTIGACION:</p> <p>Descriptivo – Analítico</p> <hr/> <p>POBLACIÓN:</p> <p>Muestras biológicas con resultado positivo a pruebas de Bluestar, remitidas a la Sección de Biología y Genética Molecular, DIRCRI-PNP, durante los 2008 al 2018 durante los años 2008-2018.</p> <p>Total: 800</p> <p>Nivel de confianza:</p> <p>95 %</p> <p>Error admitido: 5 %</p> <p>MUESTRA:</p> <p>Tamaño de muestra calculado para población infinita: 260</p>
--	--	---	--	---	---	---	---	---

<p>¿En qué medida el perfil genético parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas?</p>	<p>4. Determinar en qué medida el perfil genético parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en muestras biológicas.</p>	<p>4. El perfil genético parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas remitidas.</p>						<p>TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS</p> <p>Guía documental.</p> <p>Ficha de análisis documentario.</p> <hr/> <p>TECNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS</p> <p>Hojas de datos- Microsoft office Excel para las frecuencias.</p> <p>Programa estadístico R para la prueba del Chi cuadrado</p>
--	---	--	--	--	--	--	--	--

**02 Instrumento****FICHA DE ANÁLISIS DOCUMENTARIO****Datos de la Aplicación:****Nombre de la Entidad:** \_\_\_\_\_**Fecha de aplicación:** \_\_\_\_\_**Miembros de la Entidad que participaron:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Documentos revisados en la Entidad:**

Documentos	Tiene		Se revisó	
	SI	NO	SI	NO
Libro de registros de documentos entrantes				
Libro de registros de documentos salientes				
Libro de numeración de Informes y/o Dictámenes Periciales.				
Informes y/o Dictámenes Periciales.				

\*En caso de NO contar con alguno de los documentos de la tabla anterior, no contestar las preguntas que se refieren a ellos posteriormente.

La siguiente ficha tiene por finalidad REGISTRAR INFORMACIÓN sobre las causas por las que no se obtiene un perfil genético o se obtienen de forma parcial; en muestras biológicas con ADN crítico.

Fuente de verificación: Informes y/o Dictámenes Periciales emitidos durante los años 2008-2018.

1. ¿El perfil genético se relaciona con el ADN crítico de las muestras biológicas?

SI                      NO  
                     

2. ¿La no amplificación del perfil genético se relaciona con la usencia del ADN crítico en las muestras biológicas?

SI                      NO  
                     

3. ¿La no amplificación del perfil genético se relaciona con la escasez del ADN crítico en las muestras biológicas?

SI                      NO  
                     

4. ¿La no amplificación del perfil genético se relaciona con la inhibición del ADN crítico en las muestras biológicas?

SI                      NO  
                     

5. ¿El perfil genético parcial se relaciona con la degradación del ADN crítico en las muestras biológicas?

SI                      NO

### 03 Protocolo de extracción y purificación de ADN crítico en muestras biológicas

(Sugerido en base al Kit DNA IQ™ System-Promega Corporation)

Equipos:

- Baño Maria 65 y 70°C
- Estufa A 40 °C

REACTIVOS:

BUFFER DE INCUBACION I	Volumen	X N° de muestras
B. de Lisis	800 µL	140 µL
DTT 1M (estándar)	100 µL	17.5 µL
Pk (estándar) (18 mg/mL)	100 µL	17.5 µL
Total	1000 µL	175 µL

BUFFER DE INCUBACION II	Volumen	X N° de muestras
B. de Lisis	800 µL	90 µL
DTT 1M (estándar)	100 µL	10 µL
Total	1000 µL	100 µL

BUFFER DE LAVADO 1X (añadir al Buffer 2X)	Para 400 muestras	Para 100 muestras
Etanol 95-100 %	35 ml	15 ml
alcohol isopropílico	35 ml	15 ml

**PROCEDIMIENTO:**

1) La muestra de 0.5 mm<sup>2</sup> aprox., colocarlo en un tubo de microcentrifuga y adicionar 175 µL de Buffer de Incubación I – Incubar a 70°C / 60 min.

2) Transferir el soporte con el buffer de incubación a un tubo con canastilla, centrifugar a 14 000 rpm / 2 min y descartar la canastilla.

3) Adicionar 7 µL de resina homogenizada, vortex - incubar a T° amb./5 min (vortex cada 1min/3 seg).

4) Colocar al soporte magnético y descartar el Buffer de Incubación I, sin remover la resina, sacar del soporte magnético y adicionar 100 µL del Buffer de incubación II, vortex por 3 seg., colocar al soporte magnético y descartar el Buffer.

5) Sacar del soporte magnético y adicionar 100 µL, de Buffer de lavado 1X, vortex por 3 seg, colocar al soporte magnético y descartar el Buffer de lavado (Lavar 3 veces).

Dejar secar la resina a 40°C/15 min, como máximo, retirar de la estufa y adicionar 50 µL de Buffer de Elusion, vortex 3 seg. – incubar a 65°C / 5 min. Vortex 3 seg. – colocar al soporte magnético, recuperar el buffer con el ADN eluido y almacenar a -20°C.

**04 Protocolo de extracción y purificación de ADN critico en muestras biológicas**

**(Sugerido en base al Kit PrepFiler Express™ Forensic y el equipo de extracción automatizado de ADN AutoMate Express Forensic - The Applied Biosystems)**

**PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction System**



1. Si el tampón de lisis PrepFiler™ contiene precipitado, caliente la solución a 37°C y luego agite la botella en vórtice durante 5 segundos.
2. Lleve la temperatura del agitador térmico a 70°C.
3. Prepare una nueva solución de DTT 1.0 M disolviendo 1.54 g de Ditiotreitól (DTT, MW 154) en 10 ml de agua libre de ADN de grado de biología molecular.
4. Prepare una nueva solución de lisis PrepFiler™. Cada muestra requiere:
  - 500 µL de tampón de lisis PrepFiler™
  - 5 µL de DTT 1 M recién preparada
5. Inserte una columna PrepFiler LySep™ en un PrepFiler™ sin bisagras tubo de muestra (en conjunto, denominado "conjunto columna / tubo"), luego transfiera cuidadosamente la muestra al PrepFiler LySep columna.
6. Agregue 500 µL de solución de lisis PrepFiler recién preparada al conjunto columna / tubo.
7. Cierre bien la tapa del conjunto de columna / tubo.
8. Coloque el conjunto de columna / tubo en un agitador térmico, luego incúbelo a 70°C y 750 rpm por 40 minutos.

### **AutoMate Express™ Instrument for DNA extraction**

Comience la ejecución de extracción automatizada

1. Confirme que ha insertado el estante del cartucho y la punta y el estante del tubo correctamente luego cierre la puerta del instrumento.

2. Presione, luego, si está utilizando:

PrepFiler Express™ kit – Press 1 to select the PF Express option. Presione 1 para seleccionar la opción PF Express.

3. Presione Inicio.

La pantalla muestra los pasos y el tiempo de ejecución aproximado restante.

Almacenar el ADN extraído

Al final de la ejecución (el instrumento emite un pitido breve y la pantalla digital muestra "Protocolo terminado"):

1. Presione para regresar al menú principal, luego abra la puerta del instrumento.
2. Retire el estante del cartucho y la punta y el estante del tubo.
3. Retire y tape los tubos de elución que contienen el ADN purificado.
4. Deseche adecuadamente los cartuchos de reactivos, puntas y tubos usados.
5. Cerrar la puerta del instrumento. Después de cada carrera, limpie la punta y la rejilla del tubo según sea necesario.